

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук**

---

На правах рукописи

Мышкина Надежда Михайловна

**Создание автономно светящихся эукариот,  
экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты**

Специальность 03.01.03 - «Молекулярная биология»

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
д.х.н. Ямпольский Илья Викторович

Москва – 2020

## Содержание

Список сокращений.....	7
Введение.....	12
Актуальность темы исследования.....	13
Цель и задачи исследования.....	14
Научная новизна и практическая значимость работы.....	14
Глава I. Обзор литературы.....	15
1.1 История гетерологической экспрессии биохимических путей.....	15
1.2 Основные стратегии внедрения гетерологических путей.....	16
1.2.1 <i>In silico</i> подбор необходимого пути, подходящего организму-хозяину.....	17
1.3 Подбор организма-хозяина для гетерологической экспрессии.....	19
1.3.1 Бактерии – гетерологические хозяева.....	20
1.3.2 Дрожжи – гетерологические хозяева.....	24
1.3.3 Грибы – гетерологические хозяева.....	28
1.3.4 Растения – гетерологические хозяева.....	30
1.3.5 Несколько гетерологических хозяев одновременно.....	31
1.4 Выбор способа переноса генов метаболического пути.....	32
1.4.1 Внегеномные элементы как переносчики гетерологических генов.....	33
1.4.2 Встраивание в геном гетерологической ДНК.....	33
1.4.3 Методы сборки векторных конструкций.....	35
1.4.4. Совмещение промоторов с кодирующими последовательностями.....	37
1.5 Основные источники метаболических путей.....	38
1.5.1 Грибы как источники метаболических путей.....	39
1.5.2 Растения как источники метаболических путей.....	42
1.5.3 Бактерии как источники метаболических путей.....	47
1.5.4 Некультивируемые организмы как источники метаболических путей.....	47
1.5.5 Подход разрабатывания генома - Genome mining.....	48
1.6 Оптимизация работы гетерологического метаболического пути.....	52
1.6.1 Биоинформатическое предсказание перспективных методов оптимизации.....	52

1.6.2 Явление ингибирования продуктом и преодоление этой проблемы.....	53
1.6.3 Токсическое влияние вторичных метаболитов.....	54
1.6.4 Оптимизация регуляторных последовательностей.....	55
1.6.5 Дозирование генов.....	57
1.6.6 Технологии искусственного отбора.....	58
1.6.7 Распределение потока метаболитов и доступность субстратов.....	58
1.6.8 Редактирование генома для оптимизации экспрессии гетерологических путей.....	61
1.6.9 Преодоление проблемы недостатка кофакторов и малых органических субстратов.....	62
1.6.10 Проблема различного GC-состава генов и предпочтения кодонов.....	63
1.6.11 Оптимизация сочетания ферментов метаболического пути.....	64
1.6.12 Изменение собственных метаболических путей организма-хозяина.....	67
1.6.13 Оптимизация процесса культивации.....	68
Глава II. Материалы и методы.....	70
2.1 Реактивы, буферные растворы и культуральные среды.....	70
2.1.1 Реактивы для проведения билюминесцентных реакций.....	70
2.1.2 Культуральные среды и растворы.....	70
2.1.2.1 Среда для работы с бактериями <i>Escherichia coli</i> и <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	70
2.1.2.2 Среда для культивации дрожжей <i>Pichia pastoris</i> .....	71
2.1.2.3 Среда и растворы для работы с клетками млекопитающих НЕК293NT.....	71
2.2 Оборудование.....	72
2.2.1 Оборудование для работы с нуклеиновыми кислотами.....	72
2.2.2. Оборудование для работы с бактериями и дрожжами.....	72
2.2.3 Оборудование для работы с культурами клеток млекопитающих НЕК293NT.....	72
2.2.4 Оборудование для регистрации люминесценции.....	72
2.3 Штаммы и линии, использованные в работе.....	73
2.4 Протоколы экспериментов.....	73
2.4.1 Методы генной инженерии.....	73
2.4.1.1 Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий.....	73
2.4.1.2 Экстракция ДНК из агарозного геля после электрофоретического разделения.....	73

2.4.1.3 Секвенирование ДНК по методу Сэнгера.....	73
2.4.1.4 Высокопроизводительное секвенирование Illumina.....	74
2.4.1.5 Реакции рестрикции и лигирования ДНК.....	74
2.4.1.6 Реакции модульного клонирования ДНК.....	74
2.4.1.7 Амплификация ДНК.....	74
2.4.1.8 Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	74
2.4.1.9 Оптимизация последовательностей ДНК.....	74
2.4.1.10 Химический синтез последовательностей ДНК.....	75
2.4.1.11 Выделение геномной ДНК.....	75
2.4.1.12 Подтверждение встройки в геномную ДНК.....	75
2.4.1.13 Выделение суммарной РНК.....	75
2.4.1.14 ОТ-ПЦР.....	75
2.4.1.13 ПЦР в реальном времени.....	76
2.4.2 Методы работы с бактериями.....	76
2.4.2.1 Протокол приготовления компетентных бактериальных клеток.....	76
2.4.2.2 Трансформация клеток <i>Escherichia coli</i> методом электропорации.....	76
2.4.2.3 Трансформация клеток <i>Agrobacterium tumefaciens</i> методом электропорации.....	77
2.4.3 Методы работы с дрожжами <i>Pichia pastoris</i> .....	77
2.4.3.1 Протокол приготовления компетентных клеток дрожжей.....	77
2.4.3.2 Трансформация клеток <i>Pichia pastoris</i> методом электропорации.....	78
2.4.3.3 Отбор дрожжей <i>Pichia pastoris</i> на твёрдой среде YPDS с селективными антибиотиками.....	78
2.4.3.4 Отбор дрожжей <i>Pichia pastoris</i> на твёрдой среде RDB без добавления гистидина.....	78
2.4.3.5 Капельный тест (drop-test).....	78
2.4.4 Методы работы с культурами клеток млекопитающих HEK293NT.....	79
2.4.4.1 Пассирование культуры клеток млекопитающих HEK293NT.....	79
2.4.4.2 Трансфекция культуры клеток млекопитающих HEK293NT.....	79
2.4.4.3 Концентрирование клеток перед измерением люминесценции.....	80
2.4.5 Методы работы с растениями.....	80

2.4.5.1 Агробактериальная трансформация.....	80
2.4.5.2 Культивация растений.....	80
2.4.5.3 Отбор листьев с растений.....	80
2.4.6 Методы регистрации люминесценции.....	81
2.4.6.1 Имиджинг с помощью IVIS Spectrum CT.....	81
2.4.6.2 Имиджинг с помощью Fusion pulse.7.....	81
2.4.6.3 Имиджинг с помощью фотоаппаратов.....	81
Глава III. Результаты и обсуждение.....	82
3.1 Предпосылки работы.....	82
3.2 Определение генов, входящих в кластер цикла кофейной кислоты.....	82
3.2.1 Определение конститутивных участников кластера генов цикла кофейной кислоты.....	83
3.2.2 Подтверждение функции продукта гена <i>h3h</i> .....	84
3.2.3 Подтверждение функции продукта гена <i>hisps</i> .....	86
3.2.4 Подтверждение функции продукта гена <i>cph</i> .....	88
3.3 Создание автономно биолюминесцентных дрожжей <i>Pichia pastoris</i> .....	89
3.4 Создание автономно биолюминесцентных растений <i>Nicotiana tabacum</i> и <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	91
3.4.1 Анализ возможности создания автономно светящихся растений с помощью введения генов цикла кофейной кислоты.....	91
3.4.2 Сборка ДНК-конструкции с генами цикла кофейной кислоты и трансформация <i>N. tabacum</i> и <i>N. benthamiana</i> .....	92
3.4.3 Имиджинг светящихся растений.....	93
3.4.4 Количественное измерение свечения частей растения.....	95
3.4.5. Изменение свечения растений в течение суток.....	98
3.5. Создание автономно биолюминесцентных клеток млекопитающих НЕК293NT.....	101
3.5.1 Создание ДНК-конструкций для экспрессии в культуре клеток млекопитающих.....	101
3.5.2 Измерение люминесценции временно трансфицированной культуры клеток НЕК293NT.....	101
3.5.3 Подходы, использованные для увеличения яркости автономно биолюминесцентной культуры клеток млекопитающих.....	105

3.5.3.1 Сравнение эффективности различных кумарат-3-гидроксилаз в автономно светящейся культуре клеток млекопитающих.....	105
3.5.3.2 Оптимизация протокола регистрации люминесценции светящейся культуры клеток млекопитающих.....	107
3.5.3.3 Подбор гетерологической тирозин-аммоний-лиазы в автономно светящейся культуре клеток млекопитающих.....	109
Заключение.....	110
Выводы.....	111
Приложения.....	112
Приложение 1. Праймеры, использованные для генотипирования растений <i>N. tabacum</i> и <i>N. benthamiana</i> , экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты.....	112
Приложение 2. Ссылки на онлайн-карты плазмид, использованных для трансформации дрожжей <i>Pichia pastoris</i> .....	112
Приложение 3. Ссылки на онлайн-карты плазмид, использованных для трансфекции культуры клеток млекопитающих.....	113
Приложение 4. Ссылка на онлайн-карту плазмиды, использованной для трансформации агробактерий и последующей трансформации растений.....	113
Благодарности.....	114
Список литературы.....	115

## Список сокращений

АМФ - аденозинмонофосфат

АТФ - аденозинтрифосфат

ДМСО - диметилсульфоксид

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК - комплементарная ДНК

КоА - кофермент А

мРНК - матричная РНК

НРПС - нерибосомальная пептидсинтаза (нерибосомальные пептидсинтазы)

ОТ-ПЦР - ПЦР с обратной транскрипцией

ПКС - поликетидсинтаза (поликетидсинтазы)

п.о. - пары оснований, единица измерения длины нуклеиновых кислот

ПО - программное обеспечение

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК - рибонуклеиновая кислота

рРНК - рибосомальная РНК

СТС - сесквитерпенсинтаза (сесквитерпенсинтазы)

т.п.о. - тысяча пар оснований, единица измерения длины нуклеиновых кислот

тРНК - транспортная РНК

УФ-излучение - ультрафиолетовое излучение

ФПТаза - фосфопантетеинилтрансфераза

ФФ - пирофосфат

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР-спектроскопия - спектроскопия ядерного магнитного резонанса

4CL - 4-кумарат:КоА-лигаза

AGL0 - штамм агробактерий *A. tumefaciens*

antiSMASH - antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell, ПО для поиска кластеров метаболических генов в геномах бактерий и грибов

АСС - ацетил-КоА-синтетаза

ADS - аморфадиеенсинтаза (аморфадиеенсинтазы)

АОХ1 - alcohol oxidase I, алкоголь-оксидаза I

ArtPathDesign - алгоритм, осуществляющий поиск кратчайших гетерологических путей и оптимизацию кодонного состава входящих в них генов

attB - сайт рекомбинации

attP - сайт рекомбинации

BAC - Bacterial Artificial Chromosome, искусственная бактериальная хромосома

BLAST - basic local alignment search tool, алгоритм выравнивания последовательностей

C3H - кумарат-3-гидроксилаза

C4H - циннамат-4-гидроксилаза

Cas9 - каспаза 9

CCOMT - кофеил-КоА-3-О-метилтрансфераза

CCR - циннамоил-КоА-редуктаза

CHI - халкон-изомераза

CHR - халкон-редуктаза

CHS - халкон-синтаза

COG - Clusters of Orthologous Groups, база данных генов

COMACTER - customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering, подход подбора промотора оптимальной силы

*cph* - ген, кодирующий белок СРН

СРН - кофеилпируватгидролаза (caffeoyl-piruvate hydrolase)

CRISPR - clustered regularly interspaced short palindromic repeats, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами

Ct - cycle threshold, пороговое значение циклов в ПЦР в реальном времени

DPBS - Dulbecco's phosphate-buffered saline, фосфатный буфер Дульбекко

DTT - дитиотреитол

EggNOG - Evolutionary Genealogy of Genes: Non-supervised Orthologous Groups, база данных генов

FAC - Fungal Artificial Chromosomes, искусственные грибные хромосомы

FAC-MS - метаболомная оценка FAC

FADH<sub>2</sub> - флавинадениндинуклеотид

FBA - flux balance analysis, анализ метаболитного тока

FSI - флавон-синтаза I

FSII - флавон-синтаза II

FTIR - Fourier transform mid-Infrared spectroscopy, средне-инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье



GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GAP-pPic9 - экспрессионный вектор для дрожжей *P. pastoris*

GEM - genome-scale metabolic models, функциональное аннотирование генома

GEM-Path - алгоритм, объединяющий ретросинтетический подход и GEM-фильтры

GEM-фильтры - биоинформатические фильтры, применяющие функциональное аннотирование генома

GO - Gene ontology, база данных генов

GRAS - generally regarded as safe, статус в целом безопасных организмов

GC-MS - Gas chromatography–mass spectrometry, метод масс-спектрометрии газовая хроматография

*h3h* - ген, кодирующий белок H3H

H3H - гиспидин-3-гидроксилаза (hispidin-3-hydroxylase)

HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

*his4* - ген биосинтеза гистидина

*hisps* - ген, кодирующий белок HispS

HispS - гиспидинсинтаза (hispidin synthase)

HMMs - hidden Markov models, скрытые модели Маркова

*hrab* - ген, кодирующий белок HraB

HraB - один из белков гетеролимерной циннамат-3-гидроксилазы *E. coli*

*hrac* - ген, кодирующий белок HraC

HraC - один из белков гетеролимерной циннамат-3-гидроксилазы *E. coli*

IDT - Integrated DNA Technologies, фирма, предоставляющая услуги по кодонной оптимизации и химическому синтезу генов

IFS - изофлавоон-синтаза

IMEM - imaging modified Eagle's medium, среда для имиджинга

IRES - internal ribosome entry site, внутренний сайт посадки рибосомы

IVIS - In Vivo Imaging Software, аппаратура для регистрации люминесценции

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, база данных генов

LB - Luria broth, Lysogenic Broth, богатая среда для культивации бактерий

LP4-пептиды - linker peptide 4, пептиды-линкеры, способные к пост-трансляционному разрезанию

*luz* - ген, кодирующий белок Luz

Luz - люцифераза грибов

MEP - 2С-метил-D-эритритол-4-фосфатному путь биосинтеза изопреноидов

MES - 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота

MFA - metabolic flux analysis, анализ метаболитных токов

MIR - mid-infrared, средне-инфракрасная (спектроскопия)

MMLV - Moloney Murine Leukemia Virus, вирус лейкемии мышей Молони

MoClo - modular cloning, модульное клонирование

MS - Metabolomic Scoring, метаболомная оценка

MS-medium - Murashige and Skoog medium, среда Мурашиге и Скуга

MUT - methanol utilization pathway, путь утилизации метанола

NADH - никотинамидадениндинуклеотид

NADPH - никотинамидадениндинуклеотид-фосфат

NIR - near infrared, ближнеинфракрасная (спектроскопия)

NCBI - National Center for Biotechnology Information, национальный центр биотехнологической информации

*nncspH* - ген гриба *Neonothopanus nambi*, кодирующий белок nnCPH

nnCPH - кофеоилпируватгидролаза гриба *Neonothopanus nambi*

*nnh3h* - ген гриба *Neonothopanus nambi*, кодирующий белок nnH3H

nnH3H - гиспидин-3-гидроксилаза гриба *Neonothopanus nambi*

*nnhispS* - ген гриба *Neonothopanus nambi*, кодирующий белок nnHispS

nnHispS - гиспидинсинтаза гриба *Neonothopanus nambi*

*nnluz* - ген гриба *Neonothopanus nambi*, кодирующий белок nnLuz

nnLuz - люцифераза гриба *Neonothopanus nambi*

nnPPTase - транскрипт-кандидат, кодирующий ФПТазу гриба *Neonothopanus nambi*

OSMAC - one strain – many compounds, подход для поиска вторичных метаболитов

P450 - цитохром (белок из класса гемпротеинов)

PathMiner - алгоритм поиска кратчайших биохимических путей

PathPred - алгоритм предсказания биохимических путей

PAL - фенилаланин-аммоний-лиаза

p35s - промотор 35S рРНК вируса мозаики цветной капусты

pAOX1 - промотор гена AOX1 *P. pastoris*

pAtAct2 - промотор гена актина *A. thaliana*

PamyB - крахмал-индуцируемый промотор, полученный из гена Така-амилазы А

pCMV - промотор цитомегаловируса

pCmYLCV - промотор вируса пожелтения и курчавости цеструма

pGAL-10 - промотор, регулируемый концентрацией галактозы

pGAP - промотор гена GAPDH *P. pastoris*

pLHB1B1 - промотор гена хлорофилл-связывающего белка *A. thaliana*

pOSIP - One-Step Integration Plasmid, плаزمид для одноэтапной интеграции

PPTase - phosphopantetheinyl transferase, фосфопантетеин-трансфераза

pRS44 - ДНК-вектор ёмкостью более 200 тысяч п.о., рассчитанный на широкий круг хозяев

PTMs - polycyclic tetramate macrolactams, полициклические тетрааматные макролактамы

*rctal* - ген *Rhodobacter capsulatus*, кодирующий белок RcTAL

RcTAL - тирозин-аммоний-лиаза *Rhodobacter capsulatus*

RDB - regeneration dextrose base, минимальная среда для культивирования дрожжей

RNA-Seq - метод секвенирования РНК

ROI - region of interest, область интереса

SAM - S-аденозил-L-метионин

SMURF - Secondary Metabolite Unique Regions Finder, ПО для поиска уникальных кластеров метаболитических генов в геномах грибов

SOB - super optimal broth, богатая культуральная среда для бактерий

SSRTA - site-specific recombination-based tandem assembly, метод тандемной сборки, основанной на сайт-специфической рекомбинации

Swiss-Prot - база данных белков и генов

ТАЕ-буфер - буфер, в состав которого входят трис ацетат и ЭДТА

TAL - тирозин-аммоний-лиаза

TAL-домены - категория ДНК-связывающих белковых доменов

TEFAP - Tag-encoded FLX Amplicon Pyrosequencing, метод одновременного секвенирования многих образцов

TEV - Tobacco Etch Virus, вирус гравировки табака

TyrR - тирозиновый репрессор

YPD - yeast extract, peptone, dextrose; состав среды для культивации дрожжей

## Введение

Биолюминесценция – явление свечения в живой природе. В настоящее время известны генетические основы таких вариантов биолюминесценции, как флуоресценция [Chudakov и др., 2010; Specht и др., 2017] и люциферин-люциферазные реакции [Kaskova и др., 2016]. Однако для полноценной работы данных систем в гетерологических хозяевах необходимо некоторое воздействие извне: для флуоресцентных реакций таким воздействием является облучение возбуждающим светом, а для люциферин-люциферазных реакций – добавление экзогенного субстрата. Подобные особенности накладывают значительные ограничения на применение этих систем, однако в настоящее время биотехнологии подошли к тому рубежу, при котором станет возможным генетически кодируемое автономное свечение гетерологических организмов, что позволит убрать полностью или значительно уменьшить данные недостатки. Около трёх десятилетий накопления знаний о биолюминесцентной системе бактерий [Meighen, 1993] привели к тому, что разработаны многочисленные технологии применения этой системы для автономного свечения других бактерий [Francis и др., 2000], однако эффективное гетерологическое использование этой системы в эукариотах стало доступно только к концу 2019 года [Gregor и др., 2019].

В настоящей работе мы хотели бы осветить открытие генов биосинтеза люциферина грибов (которые в сочетании с люциферазой грибов представляют собой гены цикла кофейной кислоты) и их применение для создания автономно светящихся эукариот: дрожжей, растений и культуры клеток млекопитающих.

### **Актуальность темы исследования**

В настоящее время разработано множество разнообразных методов биоимиджинга, значительная часть которых основана либо на флуоресцентных белках, либо на люциферин-люциферазных реакциях [Pu, 2019]. Однако каждый из этих подходов имеет недостатки для применения широким кругом исследователей. В частности, для регистрации флуоресценции необходимо относительно сложное оборудование, обеспечивающее облучение образца возбуждающим светом и спектральное разделение возбуждающего и целевого сигналов, кроме того, фоновые значения флуоресценции биомолекул живых клеток могут замаскировать целевой сигнал. Люциферин-люциферазные реакции лишены этих недостатков, однако для их осуществления необходимо экзогенное добавление субстрата, что не всегда удобно в условиях работы с живыми организмами, особенно эукариотическими. Использование автономно биолюминесцентных систем позволило бы решить перечисленные выше проблемы, однако на данный момент реакции биосинтеза различных люциферинов и отвечающие за эти превращения ферменты остаются слабо изученными. На данный момент только биолюминесцентная система бактерий может претендовать на звание эффективного инструмента для создания автономно светящихся гетерологических организмов [Gregor и др., 2019], поэтому расширение палитры (как в спектральном, так и в бытовом смысле) таких инструментов позволит выйти на качественно новый уровень решения задач биоимиджинга.

### **Цель и задачи исследования**

Целью настоящей работы являлась проверка возможности создания автономно светящихся эукариот с помощью введения гетерологических генов цикла кофейной кислоты, обнаруженных в высших билюминесцентных грибах.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Найти гены ферментов биосинтеза люциферина грибов.
2. Подтвердить функции продуктов данных генов при гетерологической экспрессии в модельном организме.
3. Подобрать вспомогательные гены, продукты которых способны катализировать превращение первичных метаболитов в предшественники люциферина грибов.
4. Создать автономно билюминесцентные дрожжи, экспрессирующие гены люминесцентной системы грибов.
5. Создать автономно билюминесцентные растения, экспрессирующие гены люминесцентной системы грибов.
6. Проанализировать интенсивность свечения различных органов и тканей растения и её изменения во времени и пространстве.
7. Создать автономно билюминесцентные клетки млекопитающих, экспрессирующие гены люминесцентной системы грибов.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

В настоящем исследовании впервые в мире определены последовательности генов, кодирующих ферменты биосинтеза люциферина грибов, и подтверждена их функция в гетерологических хозяевах. Также впервые нам удалось создать автономно билюминесцентные эукариотические организмы, экспрессирующие гены цикла кофейной кислоты (дрожжи, растения, культура клеток млекопитающих). Подобные организмы и культуры клеток позволят исследовать различные биохимические процессы на клеточном и организменном уровнях, не прибегая к использованию аппаратуры для регистрации флуоресценции или расходуемого субстрата, который необходимо добавлять экзогенно.

## Глава I. Обзор литературы

### 1.1 История гетерологической экспрессии биохимических путей

Гетерологическая экспрессия генов – экспрессия чужеродного гена в клетках организма-хозяина. Данной области биотехнологии более 40 лет, одними из первых примеров гетерологической экспрессии генов являются гетерологическая экспрессия РНК гемоглобина [Chantrenne, Marbaix, 1972], трансляция мРНК человеческого глобина в различных гетерологических системах [Pritchard и др., 1974] и синтез интерферона в ооцитах *Xenopus laevis* [Cavalieri, Pestka, 1977]. За прошедшее время методология значительно расширилась и теперь можно использовать в качестве организмов-хозяев клетки практически любых живых существ, а также вводить в их геном не только отдельные гены, но и целые генетические кассеты, а также регулировать собственные биохимические пути организмов-хозяев. Подобные исследования к 90-м годам XX века дали начало целой ветви биотехнологии под названием метаболическая инженерия, для успешного применения которой нужен широкомасштабный анализ различных биохимических путей, складывающихся во взаимосвязанные сети [Voit, Torres, 2002].

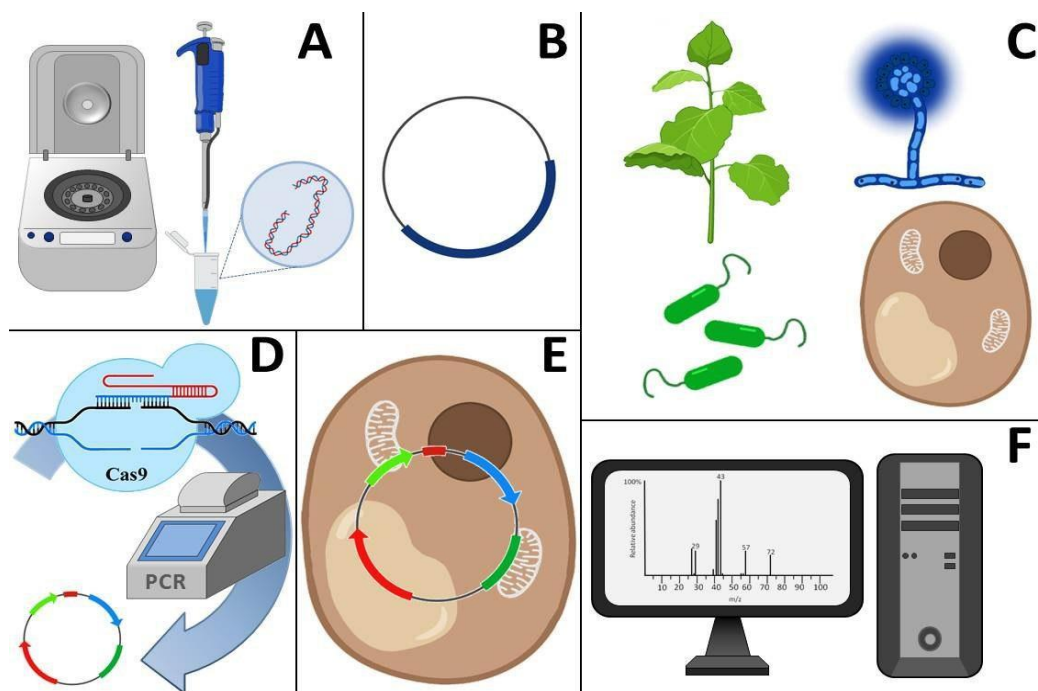
Первые успехи в гетерологической экспрессии целых метаболических путей относятся к середине 80-х годов XX века. В 1984 году исследователям удалось охарактеризовать кластер генов, ответственный за биосинтез антибиотика актинородина в *Streptomyces coelicolor* и внедрить его в геном *Streptomyces parvulus*, после чего созданный штамм начал вырабатывать актинородин [Malpartida, Hopwood., 1984].

После этого значимого успеха создание организмов, экспрессирующих гетерологические метаболические пути, лишь набирало обороты. На данный момент при запросе «heterologous pathway» в базе данных научных статей Pubmed предлагается порядка 9 тысяч работ разных лет, причём в последние годы (как, впрочем, и во многих других научных областях) выпускается всё больше научных статей.

В настоящем обзоре нет возможности осветить все современные достижения метаболической инженерии ввиду их многочисленности, однако мы рассмотрим основные методы создания гетерологических биохимических путей в различных организмах-хозяевах с наиболее интересными примерами, препятствия, возникающие при попытках внедрить чужеродный биохимический путь, и способы их преодоления.

## 1.2 Основные стратегии внедрения гетерологических путей

Для эффективного внедрения метаболического пути в гетерологического хозяина необходимо совершить следующие шаги: (1) подобрать необходимый метаболический путь для синтеза целевого соединения на основе анализа литературных источников и баз данных; (2) включить гены биосинтетического пути в подходящий стабильный вектор/векторы; (3) подобрать подходящий организм-хозяин; (4) подобрать методы для поддержания и оптимизации данного метаболического пути в гетерологическом хозяине [Ongley и др., 2013]. Основная последовательность работ показана на Рис. 1



**Рисунок 1.** Типичная последовательность работ при гетерологической экспрессии кластеров генов. А - выделение ДНК из природного источника метаболического пути (чистая культура, метагеном или смешанный образец из окружающей среды); В - встройка ДНК в векторную молекулу (клонирование библиотеки всех генов с последующим отбором целевых или направленная встройка определённого кластера); С - выбор гетерологического хозяина (по близости к организму-источнику, по доступности методов манипуляции или по содержанию веществ-предшественников); D - генетические манипуляции (замены промоторов, удаление избыточных генов, восполнение недостатков в кластерах, перенесённых частично); E - поддержание вектора в гетерологическом хозяине (давление антибиотика, случайная или сайт-специфическая встройка в геном); F - оптимизация продукции (перебор условий культивирования, добавление веществ-предшественников, метаболическая инженерия). Адаптировано из [Ongley и др., 2013].



Практически невозможно заранее предсказать, будет ли эффективным гетерологический синтез даже при соблюдении всех этих условий: в некоторых случаях гетерологический метаболический путь работает практически без дополнительных модификаций, тогда как для других путей и организмов оптимизация процесса является самым сложным и продолжительным этапом [Trantas и др., 2009; Siddiqui и др., 2012; Galanie и др., 2015; Nakagawa и др., 2016].

### **1.2.1 *In silico* подбор необходимого пути, подходящего организму-хозяину**

Для введения целого нового метаболического пути в систему уже существующих метаболических путей определённого организма необходимо учитывать очень много факторов, например, баланс между синтезом и расходом основных метаболитов, таких как NADH, АТФ и т.д. [Chaturachai и др., 2012]. Кроме того, во многих случаях неизвестны конкретные биохимические реакции, приводящие к синтезу необходимого вещества, поэтому недостаточно просто воспользоваться информацией о необходимых метаболических превращениях из открытых баз данных [Vairoch, 2000; Kanehisa и др., 2008; Chang и др., 2009; Caspi и др., 2018]. Разработан ряд алгоритмов, упрощающих данные задачи. Большая часть этих алгоритмов основана на ретроспективном соединении в цепочку биохимических превращений целевого метаболита и пула доступных в клетке-хозяине метаболитов [Campodonico и др., 2014]. В частности, к таким алгоритмам относятся PathMiner, осуществляющий эвристический поиск кратчайших биохимических путей [McShan и др., 2003] и PathPred, предсказывающий биохимические пути, приводящие к синтезу необходимого метаболита на основании известных данных о биосинтезе его структурных аналогов [Moriya и др., 2010]. Также существует алгоритм Pathway Search для поиска кратчайших гетерологических путей, дополняющих нативные, и осуществляющий подбор оптимального организма-хозяина для синтеза целевого метаболита. Данный алгоритм также осуществляет анализ метаболического потока (FBA, flux balance analysis) [Orth и др., 2010]. Поиск кратчайших гетерологических путей также осуществляет алгоритм Metahype, который дополнительно может составить рекомендации о добавлении в культуральную среду того или иного субстрата для увеличения продукции целевого метаболита [Carbonell и др., 2012]. К сожалению, в настоящее время данный ресурс недоступен.

Дополнительным преимуществом обладает платформа ArtPathDesign [Chatsurachai и др., 2013], которая является улучшенной версией алгоритма Pathway Search: помимо поиска кратчайших гетерологических путей она также производит оптимизацию кодонного состава генов, кодирующих необходимые гетерологические ферменты.

Впрочем, не всегда самый короткий гетерологический путь является наилучшим в силу того, что некоторые реакции могут требовать дополнительных кофакторов, нетипичных или ограниченных в конкретном организме-хозяине. В таком случае предпочтительно использовать алгоритмы, учитывающие количество участников в каждой конкретной реакции [Liu и др., 2015].

Реконструкция биохимических путей может идти не только с учётом известных биохимических данных, но и с использованием функционального аннотирования генома (genome-scale metabolic models, GEM) [Vijayakumar и др., 2018]. Алгоритмы, основанные на GEM, позволяют оценить наиболее вероятный источник углерода, анализировать ограничения метаболического потока, предсказывать максимум удельной скорости роста, прогнозировать продукцию рекомбинантных белков *in silico* и многое другое [Yang, Zhang, 2018]. Например, алгоритм GEM-Path объединяет ретросинтетический подход и GEM-фильтры, а также осуществляет предсказание необходимого биохимического пути с использованием информации о биосинтезе структурных аналогов [Delépine и др., 2018], а GEM iRY1243 сочетает в себе плюсы предыдущих версий GEM и позволяет предсказать параметры роста на различных источниках азота и углерода, что подтверждается экспериментальными данными RNA-Seq и исследования потоков изотопа углерода  $^{13}\text{C}$  [Ye и др., 2017].

Каким бы ни был алгоритм, который окажется наиболее эффективным в конкретном случае, поиск и предсказание метаболических путей были бы невозможны без наличия обширных баз данных генов с аннотированными функциями. К самым известным базам данных относятся: Gene ontology (GO) [Ashburner и др., 2000], Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [Kanehisa и др., 2016], Clusters of Orthologous Groups (COG) [Tatusov и др., 2003], Evolutionary Genealogy of Genes: Non-supervised Orthologous Groups (EggNOG) [Huerta-Cepas и др., 2016], Swiss-Prot [Boeckmann и др., 2003] и NCBI non-redundant (nr) protein database [Chen J. и др., 2017].

### 1.3 Подбор организма-хозяина для гетерологической экспрессии

Задача подбора оптимального гетерологического хозяина является многокомпонентной [Zhang Н. и др., 2011]. Для гетерологического биосинтеза вторичных метаболитов необходимо внедрить биосинтетические гены в геном организма-продуцента (гетерологического хозяина). Затем эти гены должны транскрибироваться, полученные РНК - транслироваться, а образовавшиеся ферменты должны приобрести правильную пространственную структуру и посттрансляционные модификации, чтобы стать функциональными. Кроме того, важно, чтобы в организме хозяина имелись подходящие субстраты для этого метаболического пути [Stevens и др., 2013, Zhang и др., 2011]. Все эти факторы накладывают жёсткие ограничения на организм-хозяин, именно поэтому его выбор является важным шагом для хорошей гетерологической экспрессии. Пока не обнаружен идеальный «суперхозяин» для гетерологической экспрессии любого метаболического пути, впрочем, спорной является даже сама возможность существования такового [Ongley и др., 2013]. Таким образом, в каждом конкретном случае исследователям приходится подбирать оптимальный организм-хозяин. Для этого необходимо выполнение нескольких условий: данный организм должен легко культивироваться в лабораторных условиях и его клетки должны быть насыщены предшественниками того метаболита, чей гетерологический биосинтез предполагается наладить [Santos и др., 2011]. К сожалению, круг потенциальных хозяев пока ещё ограничен из-за ряда факторов: только для модельных штаммов существуют рабочие методы генетических манипуляций; внедрение нового метаболического кластера может нарушить метаболический баланс организма из-за накопления токсических метаболитов; определение минимально необходимого набора генов может потребовать длительного подбора [Luo Y. и др., 2016].

В ряде случаев возможна экспрессия метаболических путей в бесклеточных системах, состоящих из липосом, в которых заключён минимально необходимый набор компонентов для транскрипции и трансляции биосинтетического пути [Quin, Schmidt-Dannert, 2014], однако более интересным и широко применимым по-прежнему является использование клеток гетерологических хозяев.

### 1.3.1 Бактерии – гетерологические хозяева

Подбор хозяев осуществляется по иерархическому принципу, в котором на первом месте стоят бактерии. Это обусловлено простотой их культивации в лабораторных условиях, высокими скоростями роста и сравнительной простотой геномов, а также широким спектром методов манипуляций с геномами, которые позволяют как избавиться их от «лишних» последовательностей, так и без значительных усилий добавить необходимые гены [Lussier и др., 2012]. На первом месте по популярности среди исследователей стоит простой и изученный организм *Escherichia coli*. На первый взгляд, кажется, что именно *E. coli* могла бы стать «универсальным» гетерологическим хозяином для любого метаболического пути [Martin и др., 2003], однако при использовании этой бактерии есть свои ограничения. Например, в случае гетерологического производства метаболитов грибного происхождения необходимо, чтобы они не обладали антимикробной активностью. Кроме того, чаще всего бактериальные хозяева используются для проверки функционирования единичных генов, а не кластеров целиком [Lazarus и др., 2014]. Для ряда метаболических путей помимо основного субстрата требуются низкомолекулярные вещества, например малонил-КоА. Для гетерологической экспрессии таких путей были сконструированы штаммы *E. coli* с нокдауном малонил-КоА-трансацилазы, что привело к повышенному накоплению малонил-КоА в клетках [Yang Y. и др., 2015] и штамм *E. coli* с мутациями в транскрипционных факторах RpoA и RpoD, который производит на 114% больше L-тирозина, чем дикий тип [Santos и др., 2012].

Для гетерологического биосинтеза метаболитов на основе бактерий можно использовать другой подход: наработать в гетерологическом хозяине все ферменты, необходимые для метаболических превращений, очистить белковые препараты и смешать их в пробирке с веществом-предшественником. Например, именно так успешно синтезировали трополон на основе гетерологически экспрессированных в *E. coli* генов ферментов биосинтетического пути *Penicillium stipitatum* [Davison и др., 2012] и псилоцибин с помощью очищенных ферментов *Psilocybe cubensis*, гены которых были экспрессированы в *E. coli* [Frike и др., 2017].

По очевидным причинам, *E. coli* является хорошим гетерологическим хозяином скорее для генов других бактерий, нежели более отдалённых организмов [Alberti и др., 2017a]. Подтверждением является успешный перенос биосинтеза ерсиниабактина (yersiniabactin) в *E. coli*, потому что именно в этом модельном организме был возможен

необходимый посттрансляционный процессинг синтазы [Pfeifer и др., 2001]. Несмотря на то, что есть ряд успешных примеров переноса метаболических путей из грибов в бактерии *E. coli* [Kealey и др., 1998], в случае гетерологической экспрессии крупных ферментов из грибов, например, поликетидсинтаз (ПКС) и нерибосомальных пептидсинтаз (НРПС), которым вдобавок необходима посттрансляционная модификация, *E. coli* остаётся не самым оптимальным хозяином [Gao и др., 2013; Alberti и др., 2017a]. Однако есть и успешные примеры гетерологического биосинтеза нерибосомальных пептидов в *E. coli*, например, исследователям удалось сконструировать целую библиотеку циклических нерибосомальных пептидов на базе *E. coli*, используя гетерологический метаболический путь биосинтеза эхиномицина, а также внося замены в гены входящих в него ферментов [Watanabe и др., 2009].

Интересным примером применения *E. coli* как гетерологического хозяина является амбициозный проект, в котором в геном *E. coli* ввели гены 3-гидроксипропионатного бицикла – метаболического пути фиксации CO<sub>2</sub>, что позволило приблизить гетеротрофный организм к автотрофному фенотипу. Очевидно, что столь значимые перемены в физиологии требуют очень тонкой настройки: например, избыточная экспрессия некоторых генов этого гетерологического пути негативно сказывалась на росте организма и приводила к мукоидному фенотипу, что, однако, ничуть не умаляет фундаментальной значимости данного проекта [Mattozzi и др., 2013]. Другим примером приближения *E. coli* к автотрофному фенотипу можно считать введение в данную бактерию 12 генов биосинтеза хлорофилла и подтверждение их функциональности [Chen G.E. и др., 2018].

Применение *E. coli* как гетерологического хозяина мало применимо, например, для кластеров генов из грам-положительных бактерий. В таком случае подходящим бактериальным хозяином могут служить актиномицеты [Dhakal и др., 2019], например, какой-либо из видов рода *Streptomyces* [Zhang и др., 2011]. Этот род содержит большое число видов, применимых для разных генно-инженерных приложений, поэтому в каждом конкретном случае можно выбрать подходящий вид. Например, геном *Streptomyces avermitilis* был оптимизирован для применения в метаболической инженерии, в частности, были удалены собственные кластеры генов, отвечающие за синтез известных вторичных метаболитов и большая часть генов транспозаз [Komatsu и др., 2010]. Из генома *Streptomyces coelicolor* были удалены последовательности общей протяжённостью 1.22 млн п.о., преимущественно, субтеломерные последовательности, а также 10 собственных биосинтетических кластеров, что также

сделало этот организм потенциально удобным хозяином для экспрессии гетерологических метаболических путей [Zhou и др., 2012]. Другие варианты применения разных штаммов *Streptomyces coelicolor* для гетерологического биосинтеза природных соединений можно узнать из обзора [Gomez-Escribano, Bibb, 2014]. Помимо *S. avermitilis* и *S. coelicolor* существует ещё не менее 10 других видов этого рода, для которых подобраны удобные экспрессионные плазмиды и экспериментально показан высокий выход гетерологического биосинтеза различных вторичных метаболитов с антибиотическим действием. Выбор подходящего хозяина для биосинтеза определённого соединения можно осуществить, основываясь на рекомендациях из обзора [Baltz, 2010].

Дополнительными плюсами бактерий из рода *Streptomyces* в роли гетерологических хозяев является то, что при экспрессии метаболических путей из других актиномицетов в этих хозяевах можно не менять нативные промоторы [Stevens и др., 2013], а также не снижать GC-состав генов, поскольку все актиномицеты обладают GC-богатым геномом и приспособлены к его эффективной репликации [Rodriguez, 2009].

Человек давно и тесно взаимодействует с молочнокислыми бактериями, поэтому неудивительно, что для них разработаны удобные методы культивации, а также они используются в качестве организмов-хозяев для гетерологической экспрессии метаболических путей. Бактерии *Lactococcus lactis* имеют статус в целом безопасных организмов (generally regarded as safe, GRAS [Song и др., 2014]). В работе [Song и др., 2014] экспериментально доказано, что они достаточно удобны для гетерологического биосинтеза изопреноидов, поскольку сочетают в себе признаки прокариот (простоту и скорость размножения) и эукариот (мевалонатный путь биосинтеза изопреноидов). Другие бактерии, например, *E. coli*, синтезируют изопреноиды по 2С-метил-D-эритритол-4-фосфатному пути, MEP. Авторам удалось не только успешно гетерологически синтезировать изопреноиды в *L. lactis*, но и удвоить их продукцию благодаря избыточной экспрессии двух генов мевалонатного пути (*mvk* и *mvaA*) [Song и др., 2014].

В качестве гетерологических хозяев могут выступать также бактерии вида *Pseudomonas putida*, которые, в отличие от других представителей этого рода, не являются патогенами человека. Большим достоинством этого организма является быстрый рост в культуре (в отличие от *Streptomyces spp.*) и богатый GC-состав генома (в отличие от *E. coli*). Также *P. putida* обладает собственной

фосфопантетеинилтрансферазой, что повышает ценность этого организма в качестве гетерологического хозяина для экспрессии генов ПКС и НРПС [Wenzel, Müller, 2005; Rodriguez, 2009]. Кроме того, *P. putida* не обладает большим количеством собственных биосинтетических путей вторичных метаболитов, поэтому в большинстве случаев удаётся избежать конкуренции за субстрат нативных и гетерологических метаболических путей [Rodriguez, 2009]. Среди примеров успешного применения данного организма – гетерологическая экспрессия метаболического пути миксохромида S из *Stigmatella aurantica*, выход которого был в пять раз больше, чем в нативном продуценте [Wenzel и др., 2005]. Также бактерии рода *Pseudomonas* успешно используются для идентификации продуктов критических метаболических путей: благодаря экспрессии в *P. putida*, *P. stutzeri* и *P. syringae* молчащего гена поликетидсинтазы из миксобактерии *S. cellulosum* было обнаружено соединение флавиолин [Gross и др., 2006].

Альтернативным вариантом бактериального организма-хозяина может служить дельтапротеобактерия *Mucococcus xanthus*. В этом организме была проведена успешная гетерологическая экспрессия окситетрациклинового биосинтетического пути из *Streptomyces rimosus*, что, в сочетании с предыдущими успехами гетерологического биосинтеза в *M. xanthus* соединений из других миксобактерий, позволило авторам статьи рекомендовать данный организм как универсальный хозяин для гетерологического биосинтеза различных поликетидов [Stevens и др., 2010]. Однако стоит отметить, что это один из немногих, если не единственный, случай гетерологической экспрессии метаболического пути из стрептомицетов в *M. xanthus* без замены нативного промотора [Stevens и др., 2013]. Если же использовать *M. xanthus* для экспрессии метаболических путей из других дельтапротеобактерий, то практически всегда можно использовать нативные промоторы, что значительно упрощает процедуру создания генетических конструкций [Stevens и др., 2013]. К ограничениям в использовании *M. xanthus* стоит отнести достаточно узкий инструментарий для генетических манипуляций с дельтапротеобактериями по сравнению с другими бактериями [Stevens и др., 2013].

Не менее интересны в качестве потенциальных хозяев для гетерологического биосинтеза вторичных метаболитов и цианобактерии, например, для дешёвого производства биотоплива. Первым примером успешной гетерологической экспрессии семи генов в фотосинтезирующем организме является работа [Bentley и др., 2014]. После внедрения в цианобактерию *Synechocystis* PCC 6803 гетерологических генов

изопренсинтазы и мевалонатного пути организм начал вырабатывать изопрен  $C_5H_8$  исключительно из неорганических субстратов ( $CO_2$  и  $H_2O$ ) благодаря перераспределению метаболического потока между анаболическими процессами самой клетки и гетерологическим путём. Другой пример использования цианобактерий – налаженный синтез бутан-2,3-диола в *Synechocystis sp.* PCC 6803. Благодаря внедрению гетерологических генов ацетолактатсинтазы, ацетолактатдекарбоксилазы и ацетоинредуктазы исследователям удалось достичь выхода 0,72 г/л гетерологических C4-соединений, в частности, 0,43 г/л бутан-2,3-диола [Savakis, 2013]. Сейчас производятся работы потенциально ведущие к гетерологическому биосинтезу соединений с большей молекулярной массой на базе цианобактерий: например, в *Synechocystis* PCC 6803 удалось подтвердить по отдельности работу всех ферментов биосинтеза транс-резвератрола, что в будущем представляет возможную платформу для его гетерологического биосинтеза [Tantong и др., 2016].

Менее распространёнными, однако по-прежнему применимыми в биотехнологии являются бактерии *Acetobacterium woodii* [Beck и др., 2020], *Corynebacterium glutamicum* [Brüsseler и др., 2019] и многие другие.

### 1.3.2 Дрожжи – гетерологические хозяева

На втором месте в иерархии рекомбинантных организмов стоят дрожжи [Lazarus и др., 2014]. У дрожжей как гетерологической системы есть большое число плюсов: это быстрорастущие одноклеточные организмы, для которых существует огромное разнообразие методов генетической инженерии, кроме того, они являются эукариотами, поэтому обладают необходимыми типичными ферментами для правильного сворачивания белков, а также способны осуществить многие, хоть и далеко не все, посттрансляционные модификации, необходимые для правильного функционирования эукариотических ферментов. Также важно, что у дрожжей как эукариот хорошо функционируют мембранные ферменты, например, цитохромы P450. Кроме того, многие виды дрожжей обладают статусом в целом безопасных организмов (GRAS), поскольку они не производят никаких известных токсических или онкогенных веществ [Alberti и др., 2017; Rodriguez и др., 2009; Yang, Zhang, 2018a]

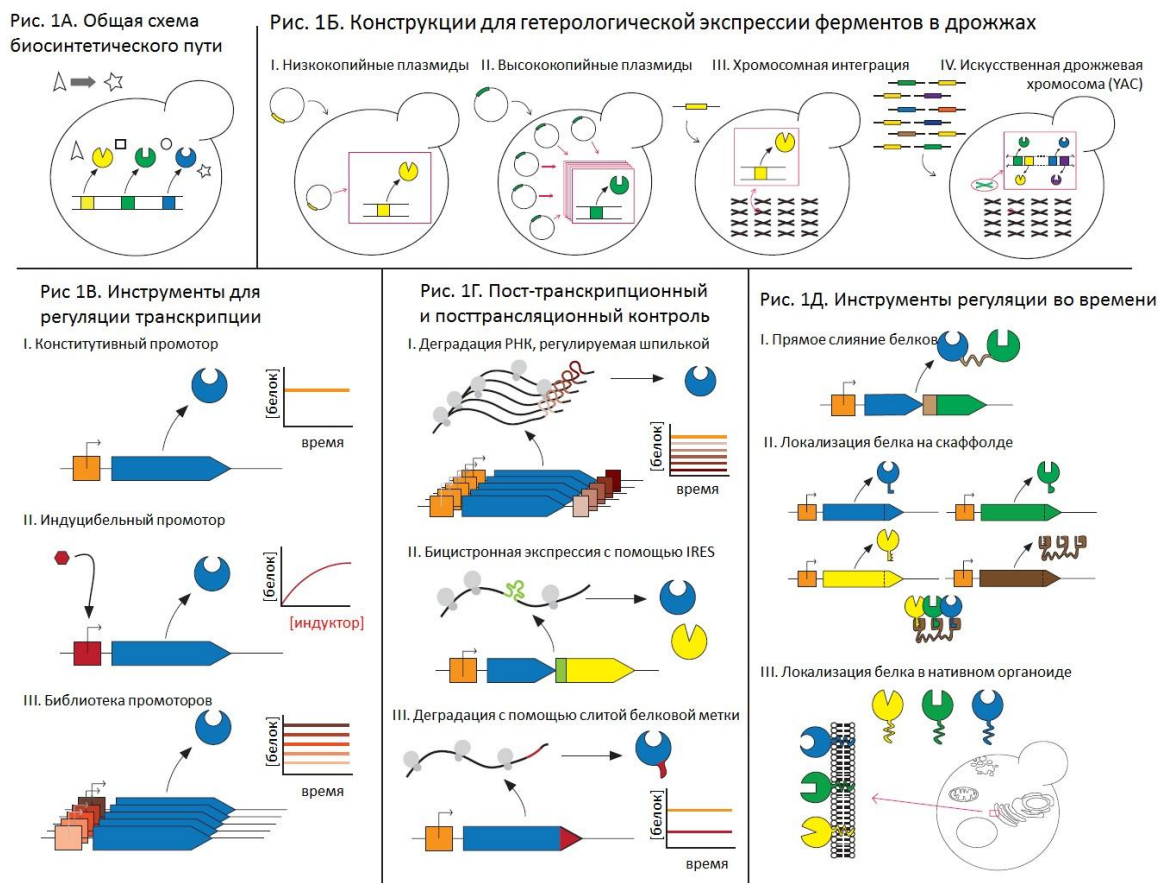
Чаще всего, дрожжи используются для исследования единичных генов, однако в гетерологической системе дрожжей также был изучен биосинтез поликетидов из грибов [Ma и др., 2009; Wang и др., 2014], причём для успешного биосинтеза



поликетидов иногда оказывается полезным объединить в одном гетерологическом хозяине гены из разных организмов, например, из грибов и бактерий [Tsunematsu и др., 2013]. Для гетерологической экспрессии в дрожжах генов из других эукариотических организмов важно освободить их от интронов [Lazarus и др., 2013]. Для удобства использования в метаболической инженерии был сконструирован штамм *Saccharomyces cerevisiae*, избыточно вырабатывающий ацетил-КоА, один из важнейших предшественников большого числа вторичных метаболитов [Lian и др., 2104].

На базе *S. cerevisiae* были успешно экспрессированы гены нескольких ПКС из лишайникового гриба *Cladosporium cladosporioides*, в результате чего были обнаружены ферменты, отвечающие за биосинтез антималярийного соединения кладоспорина [Cochrane и др., 2016]. Также благодаря экспрессии в *S. cerevisiae* PKS A и тетракетид- $\alpha$ -пиронредуктазы из *Arabidopsis thaliana* удалось добиться гетерологического биосинтеза спорополленина [Kim, 2015].

Дрожжи *S. cerevisiae* являются удобным гетерологическим хозяином, в частности, потому что разработана обширная методология контроля экспрессии гетерологических биосинтетических путей (Рис. 2). В целом, для организации гетерологической экспрессии метаболических путей, а также для ознакомления с успешными примерами гетерологического биосинтеза вторичных метаболитов в *S. cerevisiae* можно воспользоваться информацией из обзора [Siddiqui и др., 2012].



**Рисунок 2.** Инструменты для контроля экспрессии ферментов в дрожжах. А - для экспрессии и регуляции гетерологических метаболических путей в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* разработан широкий набор методов метаболической инженерии; Б - инструментарий для гетерологической экспрессии ферментов; В - регуляция транскрипции; Г - пост-транскрипционные и пост-трансляционные регуляции; Д - регуляции во времени. Адаптировано из [Siddiqui и др., 2012].

Метаболические пути могут отвечать не только за биосинтез, но и за утилизацию определённых соединений. Такие пути также могут быть интересны для гетерологической экспрессии: например, были созданы дрожжи *S. cerevisiae*, экспрессирующие ксилоизомеразный путь, чьи реакции являются ключевыми в утилизации лигноцеллюлозы [Qi и др., 2015].

Альтернативный вариант дрожжей, выступающих в роли гетерологических хозяев, – *Pichia pastoris*. Впервые они были описаны под названием *Zygosaccharomyces pastori* в 1920-х годах, затем, в 1950-х, переименованы в *P. pastoris*, а в 1995 [Yamada et al., 1995] были переклассифицированы в новый род *Komagataella*, который впоследствии был разделён на несколько видов. Не менее двух из описанных на данный момент шести видов *Komagataella* объединены традиционным названием *P.*

*pastoris*, однако для простоты допустимо называть *P. pastoris* всех представителей рода *Komagataella* [Реѝа и др., 2018].

В этих гетерологических хозяевах были успешно наработаны многочисленные рекомбинантные белки, включая мембранные, а также биологически активные метаболиты. Огромная популярность этого организма в роли гетерологического хозяина обусловлена несколькими причинами: они способны достаточно быстро наращивать биомассу, в их клетках существует вся необходимая машинерия для базовых посттрансляционных модификаций, таких как правильное сворачивание белка, формирование дисульфидных связей, а для секреторных белков *P. pastoris* способны осуществлять гликозилирование [Yang, Zhang, 2018a]. Также важной особенностью *P. pastoris* является способность использовать единственный источник углерода – метанол, хотя при необходимости эти дрожжи легко утилизируют глюкозу или глицерин [Реѝа и др., 2018]. Недавно были созданы дрожжи *Pichia pastoris*, способные в качестве источника углерода использовать CO<sub>2</sub>, что является вдохновляющим примером переключения эукариотического организма с гетеротрофного на автотрофный тип питания [Gassler и др., 2020].

Для *P. pastoris* описано много конститутивных и индуцируемых промоторов разной силы, например, метанол-индуцируемый промотор гена алкоголь-оксидазы I (alcohol oxidase I, AOX1), который активируется добавлением метанола и инактивируется добавлением глюкозы, глицерина или этанола [Vogl, Glieder, 2013], а при необходимости использования нескольких промоторов предпочтительно использовать разные во избежание спонтанной рекомбинации. В таком случае, можно выбрать несколько индуцируемых промоторов из метаболического пути утилизации метанола (methanol utilization pathway, MUT) [Vogl и др., 2016]. К конститутивным промоторам большой силы относится промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) – pGAP. Данный промотор незаменим при использовании *P. pastoris* в тех случаях, когда индуцирование промотора токсичным метанолом недопустимо, например, для продукции веществ для пищевой и фармакологической промышленности [Yang, Zhang, 2018]. Активно разрабатываются модификации сильных промоторов: например, с помощью дупликации или делеции сайтов связывания, а также избыточной экспрессии соответствующих транскрипционных факторов удаётся изменить свойства промоторов pGAP и pAOX1 [Реѝа и др., 2018].

При использовании *P. pastoris* для нужд метаболической инженерии важным плюсом является наличие секвенированных и аннотированных геномов нескольких штаммов данного организма. Актуальные аннотированные последовательности хранятся в базе данных ресурса [www.pichiagenome.org](http://www.pichiagenome.org) [Zahrl и др., 2017]. Кроме того, для удобства работы с *P. pastoris* в качестве гетерологического хозяина разработаны специальные наборы, упрощающие создание векторов, совместимых с этими дрожжами: в частности, MoClo Pichia Toolkit [Schreiber и др., 2017; Vogl и др., 2015].

Рядом примеров гетерологического биосинтеза метаболитов в *Pichia pastoris* могут служить: биосинтез S-аденозил-L-метионина (SAM), D-арабитола, изобутанола, изобутилацетата, молочной кислоты, (+)-нооткатона, даммарендиола-II, 6-метилсалициловой кислоты, цитринина, рибофлавина, разнообразных поликетидов и терпеноидов и других соединений [Peña и др., 2018].

Также гетерологическими хозяевами для метаболических путей могут служить и другие виды дрожжей, например, метилотрофные дрожжи *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia methanolica* [Hartner, Glieder, 2006] и жировые дрожжи *Yarrowia lipolytica*, способные метаболизировать сырую нефть [Madzak, 2015; Quin, Schmidt-Dannert, 2014].

### 1.3.3 Грибы – гетерологические хозяева

Ещё одним примером гетерологических хозяев являются мицелиальные грибы, например, представители рода *Aspergillus* [Zhang и др., 2011]. К несомненным плюсам грибов стоит отнести простоту их культивации и быстрый рост биомассы [Alberti и др., 2017a]. Если кластер генов взят из грибов, то эти гетерологические хозяева могут быть очень удобны, поскольку можно использовать нативные промоторы и терминаторы. Например, кластер генов биосинтеза пенициллина был успешно перемещён в *Neurospora crassa* и *Aspergillus niger* [Yaegashi и др., 2014]. Однако иногда для увеличения продукции метаболита всё-таки необходимо заменить исходный промотор на промотор организма-хозяина [Sakai и др., 2008], в частности, потому что иногда нативные промоторы сами по себе очень слабые или работают только в определённых специфических условиях [Lazarus и др., 2014].

Другим популярным модельным грибом для гетерологической экспрессии метаболических путей является *Aspergillus nidulans* [Alberti и др., 2017]. Часто в него переносят гены из других грибов рода *Aspergillus*, поскольку, несмотря на близкое

систематическое положение, физиология различных представителей этого рода сильно отличается. Например, в геном *A. nidulans* были последовательно введены 13 генов кластера биосинтеза геодина из *A. terreus* [Nielsen и др., 2013], а также в *A. nidulans* были определены функции генов биосинтеза алкалоидов спорыньи, перенесённых из *Aspergillus fumigatus* [Ryan и др., 2013].

Ещё один модельный организм из этого рода – *Aspergillus oryzae* – известен своей длительной историей участия в пищевой промышленности. Именно с его участием получают продукты из ферментированных злаков и бобовых – например, соевый соус, сакэ, мисо. Так же, как и многие другие модельные организмы, он обладает статусом GRAS [Barbesgaard и др., 1992]. Для этого гриба разработаны промоторы и селективные маркеры, благодаря использованию которых можно добиться высокого уровня гетерологической экспрессии метаболических путей. Историей успеха можно считать налаженный гетерологический биосинтез поликетиды тенеллина из гриба-патогена насекомых *Beauveria bassiana*. За этот метаболический путь отвечают 4 гена, которые были внедрены тремя векторами, под контролем крахмал-индуцируемого промотора *PamyB* (получен из гена Така-амилазы А) [Heneghan и др., 2010]. 4 гена из гриба-патогена растений *Phoma betae* отвечают за биосинтез дитерпена с антибиотическими свойствами афидиколина. Они также были успешно внедрены в геном *A. oryzae*, причём благодаря постепенному внедрению генов авторы смогли описать все интермедиаты этого биосинтетического пути [Fujii и др., 2011]. Похожий подход с поэтапной трансформацией шестью генами из *Penicillium raaxilli* позволил определить все интермедиаты и добиться устойчивого гетерологического биосинтеза паксиллина в *A. oryzae* [Tagami и др., 2013]. Ещё один успешный пример – гетерологический биосинтез в *A. oryzae* антибиотика плеуромутилина из *Clitopilus passeckerianus*. Использование сильных конститутивных промоторов позволило добиться продукции плеуромутилина в десять раз выше, чем в самом *Clitopilus passeckerianus* [Bailey и др., 2016]. Этапы биосинтеза в этом случае тоже были изучены, однако уже после внедрения самого биосинтеза [Alberti et al. 2017b].

В целом, основные стратегии для гетерологической экспрессии метаболических путей в грибах рода *Aspergillus* на примере биосинтетических путей из других грибов можно найти в обзоре [Anyaoгу и др., 2015].

### 1.3.4 Растения – гетерологические хозяева

В качестве гетерологических хозяев также могут выступать растения. Как и в случае с другими гетерологическими хозяевами, экспрессия чужеродного метаболического пути очень сильно зависит от того, есть ли в выбранном растении все необходимые метаболиты, активаторы ферментов и кофакторы. Закономерно, что растения являются хорошими гетерологическими хозяевами для метаболических путей из других растений [Jeandet и др., 2012]. Такой подход оправдывает себя в том случае, когда для биосинтеза необходимы крупные ферменты, плохо поддающиеся перенесению в значительно отличающуюся гетерологическую систему. Например, во многих метаболических путях участвуют цитохромы P450, присутствующие у всех растений, поэтому данные ферменты не надо вводить дополнительно. В прокариотических хозяевах, наоборот, собственные цитохромы менее эффективны, а введённые гетерологически растительные цитохромы плохо функционируют из-за необходимости встраиваться в мембраны, локализоваться в определённом клеточном компартменте, а также подвергаться ряду посттрансляционных модификаций [Kram и др., 2015].

При работе с растениями важно понимать, что их метаболизм в значительной степени зависит как от вида выбранного растения, так и от его вегетативной стадии, причём зачастую одно и то же растение при переходе, например, к цветению, меняет метаболический профиль практически до неузнаваемости [Li и др., 2016]. В целом стратегии метаболической инженерии растений рассмотрены в обзоре Farré и др., 2014.

Интересно, что помимо несомненной пользы для человека от выработки целевого соединения, растение с внедрённым в него гетерологическим метаболическим путём может стать более устойчивым к вредителям и патогенам, что улучшит его физиологическое состояние и, как следствие, положительно повлияет и на производство конечного метаболита. Такое, например, наблюдается для растений, гетерологически биосинтезирующих резвератрол [Jeandet и др., 2012].

Примечательно, что растение можно использовать в качестве продуцента как в виде целого организма, так и в виде культуры клеток, причём каждый из подходов имеет свои преимущества: целый организм способен расти и размножаться при минимальном участии исследователя, тогда как культура клеток обычно даёт гораздо больший выход целевого метаболита [Kram и др., 2015]. Особенно перспективны в

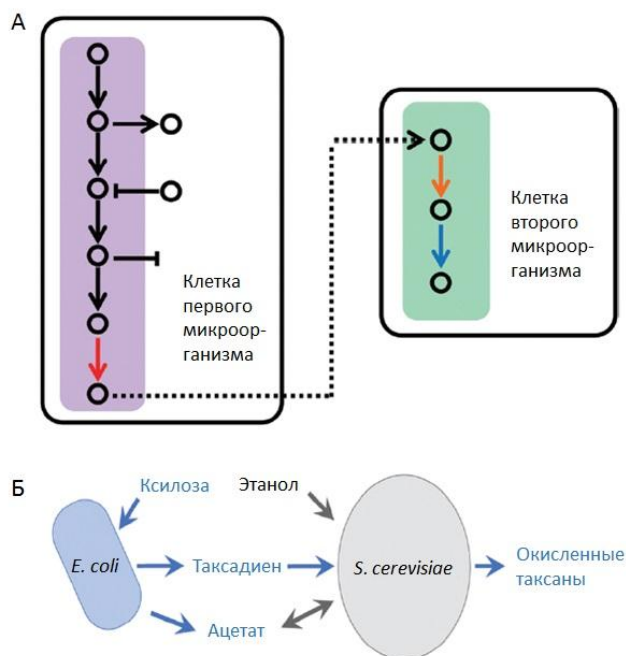
виде культуры клеток более примитивные растения: мхи и водоросли [Lohr и др., 2012].

Ещё одним плюсом использования растения в качестве гетерологического хозяина для метаболического пути является наличие в растительных клетках хлоропластов – органоидов, представляющих собой компартмент, насыщенный АТФ и разнообразными низкомолекулярными соединениями. В случае локализации всех ферментов гетерологического пути именно в хлоропласте можно добиться значительных выходов необходимого продукта – как, например, в случае с гетерологическим биосинтезом вещества с антибиотическим, противогрибковым и инсектицидным действием, изопимаровой кислоты, в листьях табака *Nicotiana benthamiana* [Gnanasekaran и др., 2015].

К минусам растений как гетерологических хозяев стоит отнести высокую стоимость их создания, относительно сложные протоколы трансформации, невысокую скорость роста и размножения, а также негативное отношение общественности к генетически модифицированным растениям – правда, последнее относится только к растениям, предназначенным в пищу [Rodriguez и др., 2009].

### **1.3.5 Несколько гетерологических хозяев одновременно**

Иногда сложные метаболические пути, требующие многочисленных биохимических превращений и больших затрат энергии, невозможно осуществить на базе одного организма-хозяина. Для таких случаев разработан подход искусственных микробных консорциумов, в которых каждый микроорганизм выполняет часть реакций гетерологического пути, в целом приводящего к биосинтезу необходимого метаболита [Люо и др., 2015]. Например, успешным подходом для синтеза таких терпенов, как таксан и ферругинол, явилось объединение гетерологических хозяев *S. cerevisiae* и *E. coli*, причём дрожжи производили цитохромы P450 (известно, что эти ферменты более эффективны у эукариот), а бактерии производили остальные ферменты для пути биосинтеза таксанов [Zhou и др., 2015], как показано на Рис. 3.



**Рисунок 3.** Создание микроорганизменного консорциума для улучшения гетерологического биосинтеза сложных природных соединений. А - схема распределения длинных биосинтетических путей в различных штаммах микроорганизмов (путь биосинтеза таксадиена в *E. coli*, таксадиен-5-альфа-гидроксилаза и таксадиен-5-альфа-редуктаза в *S. cerevisiae*); Б - искусственный консорциум *E. coli* и *S. cerevisiae*, производящий окисленные таксаны из этанола и ксилозы. Цветными стрелками обозначены гетерологические ферменты: метилэритритолфосфатный путь в *E. coli* и таксадиен-5-альфа-гидроксилаза и таксадиен-5-альфа-редуктаза в *S. cerevisiae*. Адаптировано из [Zhou и др., 2015].

#### 1.4 Выбор способа переноса генов метаболического пути

Подбор необходимого вектора для переноса генов метаболического пути во многом предопределяется организмом-хозяином, в котором планируется гетерологическая экспрессия. Вектор должен обладать способностью устойчиво воспроизводиться в выбранном хозяине либо за счёт встраивания в геном (примеры подобных подходов описаны в [Cregg, 2007]), либо как внегеномная ДНК [Mortimer и др., 2015], а закодированные в нём гены – эффективно транскрибироваться [Ongley и др., 2013].



### 1.4.1 Внегеномные элементы как переносчики гетерологических генов

Плюсами плазмидных конструкций является их простая сборка традиционными методами, достаточно большая генетическая ёмкость (до 200 тысяч п.о., как в случае с вектором pRS44, рассчитанным на широкий круг хозяев [Aakvik и др., 2009]), возможность внедрить более одной плазмиды при условии наличия в них разных селективных маркеров. К недостаткам использования плазмидных векторов можно отнести возможность их спонтанной рекомбинации в организме-хозяине, необходимость непрекращающегося селективного давления во избежание потери плазмиды или плазмид, а также необходимость использования большого количества разнообразных селективных маркеров в случае использования нескольких плазмид [Ongley и др., 2013]. Отдельно стоит отметить нестабильность плазмидных элементов при возрастании затрат клетки на их поддержание (характерно для многокопийных плазмид с сильными промоторами) – однако показано, что данная проблема возникает не всегда. В частности, разработана устойчивая высококопийная плазида для *Streptomyces* с ёмкостью вставки до 32 тысяч п.о. [Hu и др., 2003] и челночная искусственная бактериальная хромосома (Bacterial Artificial Chromosome, BAC) пригодная для простого клонирования больших генетических вставок (проверено на генетическом кластере биосинтеза меридамицина размером около 90 тысяч п.о.) и трансформации в *Streptomyces lividans* [Liu и др., 2009]. Однако иногда для уменьшения нагрузки, связанной с экспрессией чужеродных генов, имеет смысл жертвовать уровнем экспрессии и использовать плазмиды с наименьшей возможной копийностью [Rodriguez и др., 2009].

### 1.4.2 Встраивание в геном гетерологической ДНК

Альтернативным подходом является встраивание гетерологической конструкции в геном организма-хозяина. Для этого могут быть задействованы процессы гомологичной рекомбинации, транспозиции или встраивания генов вирусов в геном хозяина [Ongley и др., 2013].

Для гомологичной рекомбинации необходимо использовать вектор, лишённый возможности реплицироваться в клетках организма-хозяина и несущий целевую последовательность, фланкированную сайтами рекомбинации. Эффективность рекомбинации менее эффективна для более крупных встраиваемых фрагментов,

поэтому в случае целого кластера генов предпочтительно проводить несколько последовательных актов рекомбинации [Wang, Pfeifer, 2008].

Для транспозиции используются «прыгающие гены» – транспозоны, которые в настоящее время обнаружены у представителей всех царств живых организмов [Aziz и др., 2010]. Для транспозиции необходимо наличие фермента – транспозазы, узнающей специальные последовательности, окружающие целевой генетический фрагмент. Например, для *Mucosoccus xanthus* показано, что эффективность транспозиции значительно превышает эффективность гомологичной рекомбинации. Тем не менее, эффективность транспозиции также менее эффективна для крупных фрагментов. А эффективность последующей экспрессии, в свою очередь, зависит от места транспозиции [Fu и др., 2008]. Таким образом, случайность выбора места транспозиции предоставляет потенциал для поиска клона, в котором биосинтез целевого метаболита наиболее эффективен даже по сравнению со встраиванием в запланированный участок генома – однако в таком случае добавляется этап проверки всех полученных клонов. Дополнительным плюсом использования транспозонов является то, что одну и ту же плазмиду можно использовать для транспозиции в геномы различных организмов-хозяев [Ongley и др., 2013].

Фаговая система встройки является одним из примеров использования свойства ряда вирусов встраивать фрагменты своего генома в геном хозяина. По структурным и биохимическим особенностям этот процесс очень похож на транспозицию [Craig, 1995], но роль фермента, встраивающего ДНК, играет фаговая интеграза. Благодаря подходу фаговой встройки можно интегрировать в геном организма хозяина последовательности ДНК более 100 тысяч п.о. [Sosio и др., 2000]. Интегразы фага φC31 не требуют белков-помощников из организма-хозяина, поэтому может применяться для создания самых разнообразных гетерологических организмов: от различных бактерий [Martinez и др., 2004] до культур клеток млекопитающих [Thyagarajan и др., 2001].

На основе интегразы фага φBT1 создан метод тандемной сборки, основанной на сайт-специфической рекомбинации (site-specific recombination-based tandem assembly, SSRTA). Этот метод позволяет за один шаг собирать протяжённые конструкции из ДНК-модулей, фланкированных разными сайтами рекомбинации: мутантные attB по одну сторону каждого модуля, а мутантные attP – по другую. После взаимодействия всех модулей с интегразой фага все части соединяются воедино [Luo и др., 2016]

В вектор для переноса генов метаболического пути в гетерологический организм можно внедрить как исходные гены из организма-хозяина, так и ДНК-копии

транскриптов этих генов. Кроме того, генетический материал для встройки в вектор можно либо получить напрямую из исходных организмов, например, с помощью амплификации, либо искусственно синтезировать. Второй подход позволяет оптимизировать кодонный состав гена и его регуляторные последовательности, а стоимость безошибочного синтеза протяжённых ДНК-последовательностей становится всё ниже. Именно поэтому в последнее время предпочтение отдаётся именно такому методу [Ongley и др., 2013]. Многочисленные примеры подтверждают, что оптимизация кодонного состава значительно повышает эффективность экспрессии гетерологических генов [Yang, Zhang, 2018a].

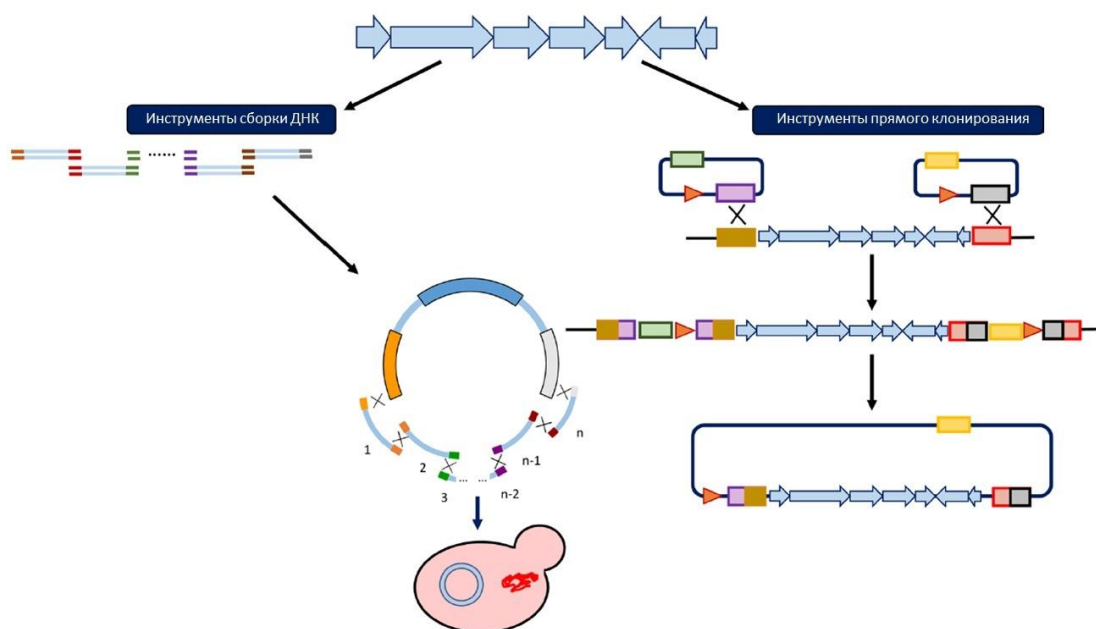
### 1.4.3 Методы сборки векторных конструкций

В настоящее время одним из самых эффективных и простых методов сборки генетических конструкций является система модульного клонирования (modular cloning, MoClo). Она основана на свойстве эндонуклеаз рестрикции типа IIS делать двухцепочечный разрыв в ДНК вне сайта узнавания. Благодаря этому образуются специфические липкие концы, последовательность которых можно заранее задать произвольно, а после лигирования фрагментов с комплементарными липкими концами в случае правильной сборки сайт узнавания эндонуклеазы не попадает в конечную ДНК-конструкцию. Это свойство позволяет проводить несколько циклов рестрикции-лигирования в одной пробирке с очень высоким выходом целевого продукта: положительные клоны с правильной последовательностью есть даже в случае сборки конструкции длиной несколько десятков т.п.о. из 11 фрагментов [Weber и др., 2011]. Экспериментальную работу значительно упрощает тот факт, что разработаны наборы стандартных частей (промоторы, терминаторы, 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности, репортерные гены и т.д.) для создания конструкций, подходящих для различных типов гетерологических организмов: растения [Engler и др., 2014], дрожжи [Lee и др., 2015] и бактерии [Moore и др., 2016].

Другим интересным и перспективным методом сборки больших ДНК-конструкций из нескольких фрагментов является метод «MASTER Ligation», основанный на единственной эндонуклеазе рестрикции MspJI, распознающей метилированный сайт mCNNR (где R = A или G) и создающей произвольный четырёхнуклеотидный липкий конец за пределами сайта узнавания. На следующем этапе несколько ДНК-фрагментов могут быть объединены в общую конструкцию,

например, так собрали биосинтетический кластер актинородина *Streptomyces coelicolor* размером 29 тысяч п.о. [Chen W.H. и др., 2013].

Интересными являются методы *in vivo* сборки больших конструкций. Например, к таким методам относится DNA Assembler, который позволяет собирать ДНК-конструкции в дрожжах благодаря методу гомологичной рекомбинации [Shao и др., 2011], как показано на рис. 4. Ещё один *in vivo* метод – реитеративная рекомбинация (reiterative recombination). Благодаря этому методу с помощью пар альтернативных эндонуклеаз и селективных маркеров можно шаг за шагом удлинять целевую конструкцию: сайты эндонуклеазного расщепления расположены между целевыми фрагментами и селективными маркерами и после расщепления акцепторного модуля донорный модуль внедряется в акцепторный благодаря гомологичной рекомбинации, замещая собой сайт узнавания эндонуклеазы и предыдущий селективный маркер [Wingler и др., 2011]. Подробнее с обзором методов *in vivo* клонирования можно ознакомиться в обзоре [Watson, García-Nafria, 2019].



**Рисунок 4.** Схема различных методов, используемых для реконструкции кластеров генов путей биосинтеза природных соединений.

Возможным и очень удобным является объединение сразу двух этапов создания гетерологического метаболического пути: «клонтеграция». Авторы создали гибридный вектор – плазмиду для одноэтапной интеграции (One-Step Integration Plasmid, pOSIP),

состоящую из модуля для клонирования, температурно-зависимого интеграционного модуля, содержащего ген интегразы, и участка attP, необходимого для сайт-специфической рекомбинации в сайт attB бактериальной хромосомы. С помощью данного вектора можно одновременно осуществлять как клонирование, так и интеграцию созданной конструкции в бактериальный геном (клонтеграцию), что помогает внедрить несколько экспрессионных кассет в различные участки бактериальной хромосомы [St-Pierre и др., 2013].

#### **1.4.4. Совмещение промоторов с кодирующими последовательностями**

Важным этапом при сборке векторных конструкций является выбор подходящих промоторов (подробно описан ниже в разделе «1.6 Оптимизация работы гетерологического метаболического пути»). В данном разделе мы остановимся на технической стороне сборки мультигенных конструкций с подобранными промоторами.

Совместить выбранные промоторы с генами в настоящее время не является сложной технической задачей: например, группа под руководством Брэди разработала метод, основанный на гомологичной рекомбинации дрожжей, селективной системе, восстанавливающей ауксотрофность, и ортогональных по последовательностям кассетах промоторов. Данный метод позволяет заменить все нативные промоторы в кластере на конститутивно активные, что было подтверждено авторами на кластерах с известной функцией, а также на выделенном из окружающей среды молчащем криптическом кластере *Lzr*, содержащем псевдогены, что привело к гетерологическому биосинтезу индолилтриптолиновых антипролиферативных соединений – лазаримидов А и В [Montiel и др., 2015]. Альтернативным подходом является подбор филогенетически близкого к нативному продуценту гетерологического хозяина, например, при гетерологическом биосинтезе поликетидов в модельных *Streptomyces*, тогда как метаболические пути взяты из менее изученных стрептомицетов [Stevens и др., 2013b].

После создания искомого вектора/векторов необходимо внедрить их в организм-хозяин. В настоящее время разработаны высокоэффективные методы трансформации практически любого организма [Cregg, 2007], а затем следует озаботиться поддержанием работы внедрённого кластера [Ongley и др., 2013].

### 1.5 Основные источники метаболических путей

Очевидно, что прежде чем переходить к гетерологической экспрессии метаболических путей, необходимо сначала эти пути обнаружить. Перспективными источниками метаболических путей для последующей их гетерологической экспрессии являются организмы, насыщенные разнообразными вторичными метаболитами (соединениями, не являющимися необходимыми для роста данного организма [Andersen и др., 2013]). Наиболее богатыми в этом плане являются грибы и растения, а эмпирически показано, что многие вторичные метаболиты являются важными фармацевтическими и биотехнологическими соединениями – например, 68% соединений, обладающих антираковой активностью, и 52%, обладающих противомикробной активностью, (61% и 49%, соответственно, по другим данным) являются природными соединениями или их производными [Newman, Cragg, 2012].

Всего известно порядка 1 миллиона природных соединений, причём четверть из них проявляют какую-либо биологическую активность. Большая часть из них (около 60%) выделена из растительных источников, а среди оставшихся 40% подавляющее большинство соединений имеет микроорганизменное происхождение, причём значительная часть из них (порядка 42%) обнаружена в грибах [Demain, 2014].

У многих организмов существуют «молчащие» метаболические пути, которые либо неактивны в условиях исследования, либо отвечают за производство слишком малых количеств метаболитов. Подобные биосинтетические пути, чьи конечные метаболиты сложно идентифицировать, называются криптоическими [Ongley S.E. и др., 2013], а способ их исследования - «cryptic pathway exploration» [Luo и др., 2015]. Несмотря на то, что потенциально они могут отвечать за производство крайне полезных для человека вторичных метаболитов, отдельной амбициозной задачей является необходимость активизировать криптоические пути. В частности, в нативном хозяине данные пути большую часть времени могут находиться в неактивном состоянии, а экспрессироваться только в строго ограниченных условиях: например, при достижении определённой фазы жизненного цикла, голодании или при специфических изменениях pH [Stevens и др., 2013b]. Совмещение подтверждённых для данного гетерологического хозяина сильных промоторов с генами криптоического биосинтетического пути может оказаться эффективным подходом для активации пути и определения его продукта, что было подтверждено для кластера генов биосинтеза спектинабилина и полициклических тетрааматных макролактамов (polycyclic tetramate

macrolactams, PTMs) из *Streptomyces orinoci* и *Streptomyces griseus*, соответственно [Shao и др., 2013], а также при производстве нового класса пептидных антибиотиков из бактерий-симбионтов нематод *Photorhabdus sp.* [Imai и др., 2019].

Для обнаружения продуктов криптических биосинтетических путей из грибов был разработан штамм *A. nidulans* с удалёнными из генома кластерами генов биосинтеза многих вторичных метаболитов [Chiang и др., 2013], а для поиска продуктов молчащих путей из бактерий *Streptomyces* разработан целый ряд инструментов синтетической биологии [Lee N. и др., 2019].

Мы остановимся на самых значимых классах природных соединений, чьи пути биосинтеза могут быть перенесены в гетерологические организмы, однако наибольший интерес в данном обзоре представляют вещества, обнаруженные в грибах.

### 1.5.1 Грибы как источники метаболитических путей

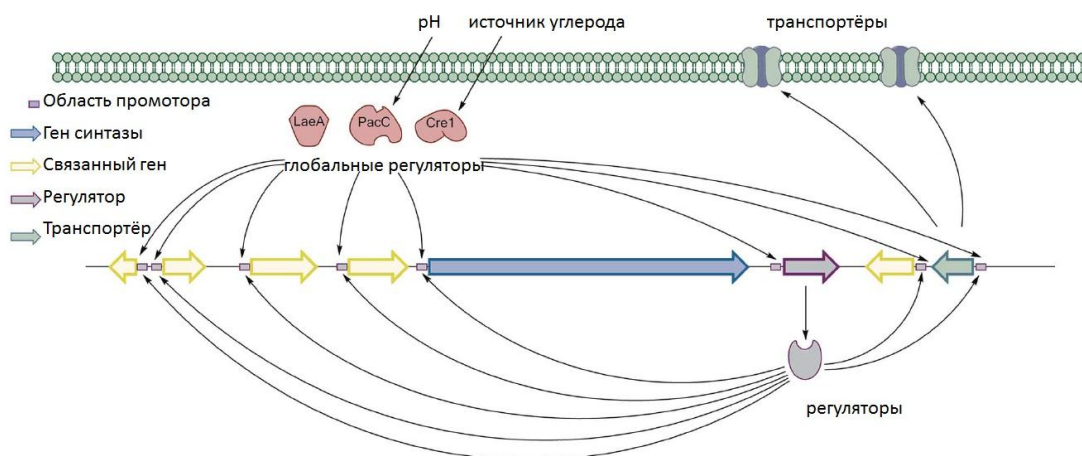
В настоящее время наиболее охарактеризованной группой грибов является отдел Аскомикота (Ascomycota) – примерно 70% от всех описанных грибов [Schmidt-Dannert, 2016]. Во многом это обусловлено тем, что большая часть биотехнологически значимых грибов (например, дрожжи и плесневые грибы) относится именно к отделу Аскомикота. В частности, Аскомикота являются важным источником природных соединений, одним из наиболее известных примеров которых является пенициллин [Demain, Elander, 2009]. Однако в последнее время всё больше внимания уделяется представителям отдела Базидиомикота, в частности, потому что данные грибы обладают эффективными механизмами разложения лигнина и целлюлозы. Не менее интересным является обширный набор вторичных метаболитов Базидиомикота, многие из которых обладают доказанной или потенциальной ценностью для медицины [Chen J. и др., 2017; Andersen и др., 2013]. Таким образом, грибы являются прекрасным, но малоизученным источником метаболитических путей, знания о вторичных метаболитах которых постоянно обогащаются [Oikawa, 2020].

Дополнительной особенностью физиологии грибов является то, что при разных условиях культивирования и составах сред один и тот же организм способен вырабатывать различный набор вторичных метаболитов, для эффективного обнаружения которых был разработан специальный подход OSMAC (one strain – many compounds, [Vode и др., 2002]), при котором для одного и того же штамма варьируют условия культивации и анализируют выработку вторичных метаболитов.

Многие метаболические пути являются молчащими из-за эпигенетической регуляции (например, метилирование ДНК). В таком случае, эти гены можно активизировать с помощью подхода ремоделирования хроматина (например, используя ингибиторы ДНК-метилтрансферазы, такие как 5-азациитидин). В результате такого воздействия профиль выработки вторичных метаболитов может поменяться очень сильно [Lin и др., 2013, Chung и др., 2013]. Этот подход обладает ещё тем плюсом, что для него не является необходимым полногеномное секвенирование организма, поэтому он может быть эффективным просто в комбинации со стратегиями OSMAC [Chávez и др., 2008].

Тем не менее, анализ геномов может приводить к обнаружению большего числа биосинтетических кластеров, чем может быть обнаружено самих вторичных метаболитов при переборе условий культивирования. Потенциально геномная разработка (genome mining) более перспективна, чем подходы OSMAC, однако как любой биоинформатический метод нуждается в экспериментальном подтверждении [Chávez и др., 2015].

Уточнение функции продукта гена проводится нокаутом, что является первым шагом к установлению функции всего биохимического пути. Грибы являются продуцентами поликетидов, терпенов и нерибосомальных пептидов, которые могут иметь важное фармацевтическое и коммерческое значение, если удастся производить их гетерологически в удобном штамме-продуценте [Lazarus и др., 2014]. Удобство грибов как организмов, из которых берётся новый биохимический путь, заключается в том, что гены, отвечающие за разные стадии одного и того же пути, часто кластеризованы в одном генетическом локусе [Keller и др., 2005] (Рис. 5).



**Рисунок 5.** Обобщённое изображение кластера генов вторичного метаболизма грибов и регуляции их экспрессии. Адаптировано из [Lazarus и др., 2014].



Более того, иногда в том же кластере закодированы факторы регуляции транскрипции этих генов, гиперэкспрессия которых приводит к увеличению экспрессии генов данного кластера [Brakhage, 2013]. К сожалению, данный подход не универсален и не всегда приводит к (значимому) увеличению количества продукта.

Пул вторичных метаболитов в грибах, в частности, в базидиомицетах, очень велик и состоит из большого количества фармацевтически значимых соединений [Wawrzyn и др., 2012]. Анализ геномов грибов может приводить к обнаружению биотехнологически важных метаболических путей. Успешным примером может служить обнаружение в геноме биолюминесцентного гриба *Omphalotus olearius* двух кластеров генов, отвечающих за синтез сесквитерпена иллюдина, обладающего антираковой активностью [Schobert и др., 2011]. В геноме предсказывали наличие генов сесквитерпенсаинтаз на основе гомологии с известными сесквитерпенсаинами из модельного гриба *Coprinus cinereus*, в составе генов предсказывали интроны и проверяли функцию белков с помощью гетерологической экспрессии соответствующих генов в *E. coli* и анализа продуктов с помощью метода GC-MS [Wawrzyn и др., 2012]. Благодаря похожему подходу в транскриптоме гриба *Lignosus rhinocerotis* были обнаружены три гена, кодирующие сесквитерпенсаиназы, при гетерологической экспрессии которых в дрожжах *S. cerevisiae* наблюдался биосинтез ряда сесквитерпеновых спиртов, часть из которых демонстрировала цитотоксическую активность [Yar и др., 2017].

Комбинированный подход создания искусственных грибных хромосом (Fungal Artificial Chromosomes, FAC) и метаболомной оценки (Metabolomic Scoring, MS), FAC-MS, позволил проверить 56 биосинтетических кластеров из различных грибов рода *Aspergillus* в генетически удалённом от них виде *Aspergillus nidulans* и достоверно связать 15 из них с биосинтезом определённых вторичных метаболитов, например, макролактоном валактамидом А [Clevenger и др., 2017].

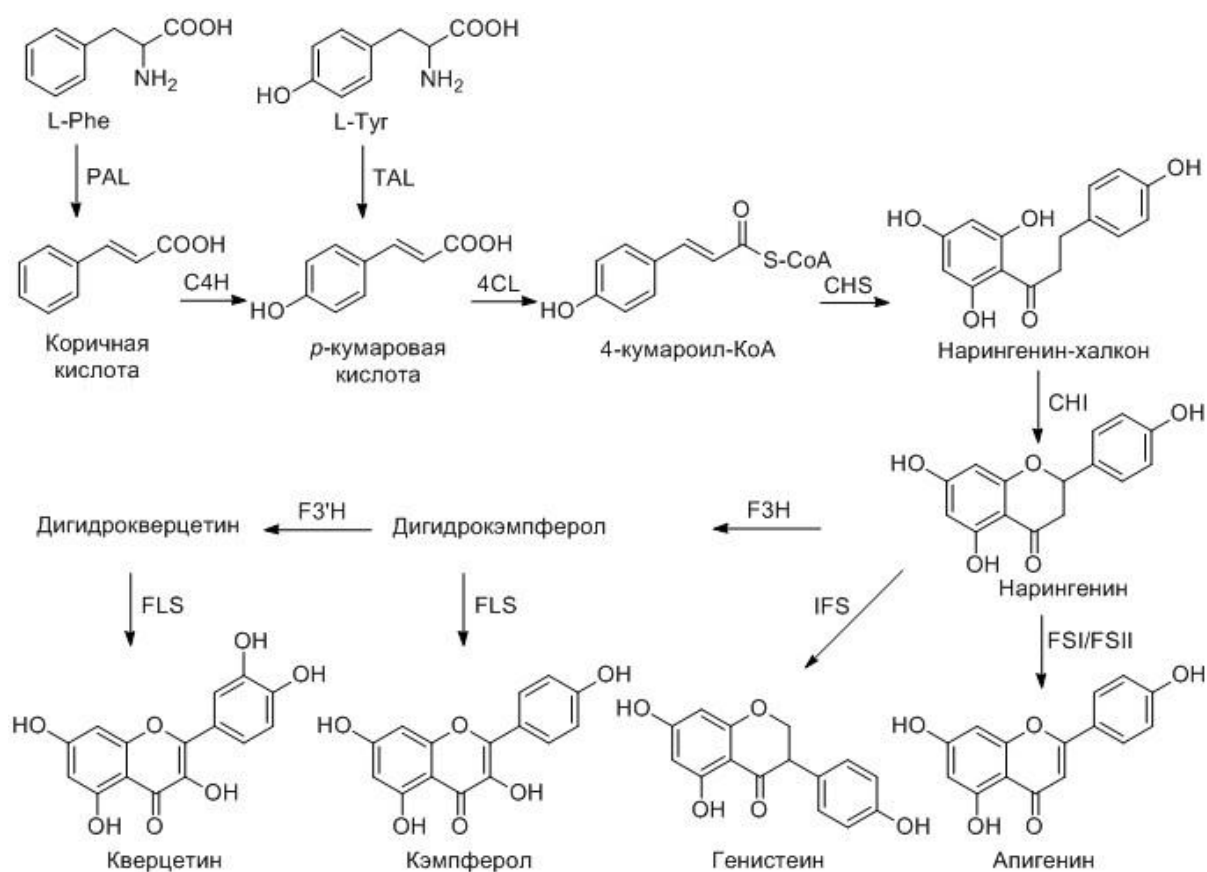
В настоящее время биоинформатические методы активно развиваются в связи с общим технологическим скачком в области информационных наук. Поэтому зачастую экспериментальные методы проверки запаздывают относительно биоинформатических предсказаний. Несмотря на явную необходимость экспериментальных подтверждений, существует несколько очень перспективных биоинформатических исследований, которые мы рассмотрим ниже.

Анализ генома и транскриптома базидиомицета *Hericium erinaceus* позволил предсказать генетические кластеры, предположительно кодирующие метаболические пути синтеза терпеноидов и поликетидов [Chen J. и др., 2017]. Группа под руководством Мортенсена разработала подход для предсказания по аннотированным геномам грибов кластеров генов метаболических путей, а также суперкластеров – физически разделённых кластеров генов. Данный метод анализа был проверен на геноме *Aspergillus nidulans* и выявил 58 кластеров, организованных вокруг синтаз вторичных метаболитов, 16 из которых оказались уже известными, причём 13 из них были предсказаны очень точно [Andersen и др., 2013].

Программное обеспечение (ПО) SMURF (Secondary Metabolite Unique Regions Finder), доступное по веб-адресу <https://www.jcvi.org/smurf>, осуществляет поиск по геномам грибов, находящимся в открытом доступе, и предсказывает потенциальные кластеры метаболических генов, часть из которых совпадает с уже описанными кластерами. Однако авторы признают необходимость экспериментальной проверки полученных результатов для остальных предсказанных кластеров [Khaldi и др., 2010]. Похожим аналитическим инструментом является antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell), расположенный по адресу <https://antismash.secondarymetabolites.org/>, позволяет предсказывать неизвестные генетические кластеры в геномах грибов и бактерий на основе информации про известные кластеры [Medema и др., 2011]. На данный момент актуальной является пятая версия данного ПО [Blin и др., 2019].

### 1.5.2 Растения как источники метаболических путей

Одни из важных широко применяемых в медицине классов вторичных метаболитов растений и грибов – флавоноиды (органические соединения, содержащие не менее одного гидроксированного ароматического кольца) [Luo и др., 2015]. Добыча флавоноидов из природных источников технологически не очень удобна, поэтому так привлекателен их гетерологический биосинтез. На 2015 год более чем 20 биосинтетических путей флавоноидов из растений и грибов были успешно перенесены в рекомбинантных хозяев – бактерии и дрожжи [Trantas и др., 2009; Siddiqui и др., 2013]. Общим интермедиатом практически для всех путей биосинтеза флавоноидов (Рис. 6) является паракумаровая кислота. Это соединение, в свою очередь, образуется из фенилаланина за два шага или из тирозина за 1 шаг.



**Рисунок 6.** Схема различных биосинтетических путей флавоноидов. PAL, фенилаланин-аммоний-лиаза; TAL, тирозин-аммоний-лиаза; 4CL, 4-кумарат:КоА-лиаза; C4H, циннамат-4-гидроксилаза; CHI, халкон-изомеразы; CHR, халкон-редуктаза; CHS, халкон-синтаза; FSI, флавоно-синтаза I; FSII, флавоно-синтаза II; IFS, изофлавоно-синтаза.

Не менее широким биотехнологическим применением обладают поликетиды, разнообразие которых в клетках бактерий, грибов и растений также очень велико [Luo и др., 2015]. Несмотря на то, что источником поликетидов в природе чаще всего являются растения, очистка из природных источников зачастую затруднительна: поликетиды не накапливаются в растениях в больших количествах, а их синтезу в растительном организме часто предшествует длительный этап роста [Lussier и др., 2013]. Именно поэтому гетерологический биосинтез поликетидов зачастую более оправдан. Однако наладить этот процесс не так просто, например, стоит учитывать обстоятельство, что некоторые поликетидсинтазы (а именно, поликетидсинтазы I и II типа, в отличие от III типа) для активации требуют посттрансляционной модификации в виде фосфоантетеинилирования, которую осуществляет фермент фосфоантетеинилтрансфераза (phosphoantetheinyl transferase, PPTase, ФПТаз),

который может отсутствовать в организме-хозяине [Ongley S.E. и др., 2013; Stevens и др., 2013b]. Дополнительной сложностью является то, что данный фермент редко закодирован в том же кластере генов, что и ферменты биосинтеза поликетидов, а также далеко не каждая ФПТаза активирует конкретную поликетидсинтазу, поэтому поиск подходящего фермента может представлять собой отдельную сложную задачу [Ongley S.E. и др., 2013].

Для разнообразных поликетидов (резвератрол, нарингенин, пиноцембрин и т.д.), исходно обнаруженных в растениях, сейчас полностью расшифрованы метаболические пути и успешно внедрены в гетерологические организмы [Lussier и др., 2013]. Уже более 15 лет рекомбинантные бактерии *Escherichia coli* используются для биосинтеза поликетидов: в 2003 году был создан штамм, вырабатывающий флавононы (пиноцембрин и нарингенин), в результате внедрения в геном искусственного генетического кластера, состоящего из трёх генов, взятых из дрожжей, актиномицетов и растения [Hwang и др., 2003, Kaneko и др., 2003].

Примером эффективного гетерологического биосинтеза нарингенина в *E. coli* может служить работа [Wu и др., 2014]. Авторам удалось добиться выхода 100 мг/л культуры благодаря методике модульной оптимизации гетерологического пути: вкратце, весь путь разбивается на модули (в данном случае их было 3) и для каждого из модулей подбираются оптимальные условия; после подбора условий для каждого из модулей определяется баланс между модулями и весь метаболический путь соединяется [Ajikumar и др., 2010]. Отдельно стоит отметить, что авторам удалось наладить синтез нарингенина из такого простого субстрата как D-глюкоза [Wu и др., 2014].

Ещё одним примером биотехнологически значимого поликетидов является антибиотик эритромицин, проблемы и успехи гетерологического биосинтеза которого подробно описаны в обзоре [Zhang и др., 2011].

Гетерологический биосинтез поликетидов также налажен в эукариотических продуцентах, например, в дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* удалось успешно внедрить путь биосинтеза руброфузарина [Rugbjerg и др., 2013].

Среди различных поликетидсинтаз выделяют поликетидсинтазы I типа – большие мультимодальные белки, которые практически в одиночку осуществляют всю цепочку превращений от стартового субстрата до конечного соединения, поэтому для гетерологического биосинтеза многих поликетидов достаточно внедрить в организм

хозяина только один ген – ген ПКС (разумеется, при условии, что в клетке хозяина есть необходимые метаболиты) [Stevens и др., 2013b].

Изопреноиды (биосинтетические производные мевалоновой кислоты) и, в частности, терпеноиды (кислородсодержащие изопреноиды) являются важными веществами, применимыми в разнообразных областях: от лечения раковых заболеваний до косметологической промышленности [Misawa, 2011]. Добыча изопреноидов традиционными методами не всегда оправдана, поэтому в последнее время активно разрабатываются подходы внедрения гетерологических путей биосинтеза различных изопреноидов в бактерии (*E. coli*) и дрожжи (*S. cerevisiae*) [Ramos и др., 2014; Muntendam и др., 2009]. Первые успехи в гетерологическом биосинтезе изопреноидов относятся к началу XXI века: в геном *E. coli* ввели гены мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов из *Saccharomyces cerevisiae* и синтетический ген аморфа-4,11-диенсинтазы (кодирующий белок, идентичный по аминокислотной последовательности аморфа-4,11-диенсинтазе из *Artemisia annua*), в результате чего наблюдался биосинтез терпеноида аморфадиена, предшественника артемизинина – соединения с антималярийными свойствами [Martin и др., 2003], что позволило получить с помощью полусинтетического подхода и сам артемизинин [Zhang и др., 2011]. Биосинтез другого предшественника артемизинина – артемизиновой кислоты – оказался возможным при одновременной трансформации ядерного и пластидного геномов табака [Fuentes и др., 2016]. В настоящее время гетерологический биосинтез артемизинина возможен в одном гетерологическом хозяине - жировых дрожжах *Yarrowia lipolytica* [Marsafari, Xu, 2020].

Другой успешный пример гетерологического биосинтеза изопреноидов – работа Рамос и коллег [Ramos и др., 2014]. Они разработали штамм *E. coli* с повышенным синтезом изопрена (2-метил-1,3-бутадиена) из D-галактозы с помощью комбинирования двух различных метаболических путей: путь де Лея-Дудорова, ответственный за превращение D-галактозы в эквимольные количества пирувата и глицеральдегид-3-фосфата [Wong, Yao, 1994] и метилэритритолфосфатный путь, превращающий эти субстраты в изопрен [Zhao и др., 2013].

Гетерологический биосинтез изопреноидов растительного происхождения применяется также в случае необходимости подтверждения функций генов. Например, гетерологическая экспрессия генов *TaGA20ox2*, *TaGA20ox3* и *TaGA20ox4* пшеницы в *E. coli* была применена для доказательства участия их в биосинтезе гиббереллина [Pearce и др., 2015].

Алкалоиды – ещё одна группа ценных органических веществ, получаемых как из природных источников (растительные, бактериальные, грибные и даже животные), так и гетерологическими методами [Kishimoto и др., 2016]. Общими чертами этой обширной группы химических соединений являются наличие атома азота в составе молекулы и отчётливый оказываемый ими физиологический эффект (в качестве яркого примера алкалоидов можно привести морфин). Интересным представителем группы индольных алкалоидов является стриктозидин, который стоит в развилке многих путей биосинтеза других алкалоидов, что делает его интересным объектом для гетерологического биосинтеза. Благодаря внедрению 21 гетерологического гена и делеции трёх генов был создан штамм дрожжей, производящих стриктозидин [Brown и др., 2015]. 16 из внедрённых генов кодировали ферменты, непосредственно участвующие в биосинтезе стриктозида, ещё 3 кодировали белки, улучшающие активность P450, а остальные были продублированными копиями генов самих дрожжей для увеличения эффективности метаболического пути. Для синтеза других алкалоидов с важным медицинским значением – бензилизохинолиновые алкалоиды – также был сконструирован штамм дрожжей *S. cerevisiae* [Hawkins, Smolke, 2008]. Эти же исследователи разработали штаммы дрожжей, биосинтезирующие в ответ на добавление экзогенного тебаина такие опиоидные алкалоиды, как кодеин, морфин, гидроморфин, гидрокодон и оксикодон [Thodey и др., 2014]. Тебаин, в свою очередь возможно гетерологически производить в дрожжевом штамме из простого сахара [Galanie и др., 2015] или в рекомбинантных бактериях *E. coli* из глицерина [Nakagawa и др., 2016]. Алкалоид псилоцибин, обладающий медицинским значением и традиционно добываемый из грибов рода *Psilocybe*, теперь также производят гетерологически в грибах *A. nidulans* [Hoefgen и др., 2018] и дрожжах *S. cerevisiae* [Milne и др., 2020].

Каннабиноиды - ещё одна важная категория веществ из растений, имеющая медицинское и бытовое значение. На данный момент ряд каннабиноидов как известных из природных источников, так и их аналогов, может быть синтезирован в дрожжах [Luo и др., 2019].

### **1.5.3 Бактерии как источники метаболических путей**

Несомненно, бактерии также относятся к категории организмов, метаболические пути которых могут быть интересны для гетерологической экспрессии, однако в настоящем обзоре нет возможности осветить все метаболические пути живых организмов. Однако можно рекомендовать обзор [Нуо и др., 2018] для ознакомления с наиболее перспективными метаболическими путями бактерий.

### **1.5.4 Некультивируемые организмы как источники метаболических путей**

Разнообразие микроорганизмов крайне велико, однако подавляющая их часть не поддается культивированию в лабораторных условиях. Тем не менее, современные технологии метагеномного секвенирования позволяют открывать новые гены и генетические кластеры даже тех микроорганизмов, которые не существуют в виде лабораторных штаммов [Ongley S.E. и др., 2013]. Подобные кластеры потенциально являются источником неизвестных метаболических путей, отвечающих за биосинтез веществ с важными фармацевтическими и иными биотехнологическими свойствами. Однако не стоит забывать, что подобный подход обладает рядом серьезных ограничений, например, различия в предпочтении кодонов между исходным и гетерологическим организмами, низкая узнаваемость регуляторных последовательностей (в частности, промоторов), необходимость наличия в организме-хозяине подходящих прекурсоров для биосинтетического пути, а также внедрение в организм-хозяин сразу всех необходимых генов из кластера [Craig и др., 2010].

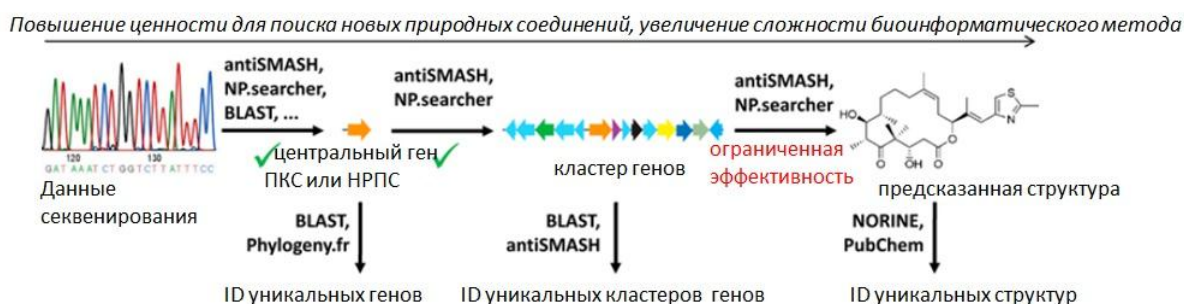
Успешный пример метагеномного исследования – работа [Woodhouse и др., 2013], в которой с помощью метода одновременного секвенирования многих образцов TEFAP (Tag-encoded FLX Amplicon Pyrosequencing) были изучены экологические ниши на базе австралийских морских губок. Выяснилось, что они являются прекрасным источником природных соединений, в частности, поликетидов и нерибосомальных пептидов.

Порядка 70-90% грибов, обитающих в экстремальных условиях, не поддаются культивированию в лаборатории [Chávez и др., 2015]. Тем не менее, физиология именно этих организмов максимально отличается от физиологии обитателей привычных нам условий, поэтому именно в таких грибах можно обнаружить неизвестные ранее природные соединения с новыми биологическими активностями. Например, эти грибы являются источниками полиолов, которые демонстрируют осмотическую активность и

криопротекторную функцию и меланинов грибов, защищающих их от УФ-излучения и также являющихся криопротекторами [Chávez и др., 2015].

### 1.5.5 Подход разрабатывания генома - Genome mining

Вне зависимости от того, из какого организма или организмов планируется выделить метаболический путь, в настоящее время перспективным является подход разрабатывания генома (genome mining). Он заключается в поиске и предсказании функции генов из изученных геномов и метагеномов на основании сходств с уже известными генами. Сейчас разработано большое количество алгоритмов, позволяющих с высокой точностью предсказать функции многих генов. В целом последовательность их применения указана на Рис. 7.



**Рисунок 7.** Биоинформатический подход может являться основным при поиске кластеров биосинтетических генов, отвечающих за биосинтез новых природных соединений, с помощью подхода разрабатывания генома. Адаптировано из [Boddy, 2014].

Для начала необходимо сузить круг поисков биосинтетического пути до путей определённого типа – например, только тех, чьими продуктами являются определённые категории метаболитов. Рассмотрим последовательность действий для поиска новых путей биосинтеза поликетидов и нерибосомальных пептидов.

Необходимо идентифицировать в пределах генома искомый биосинтетический путь. Чаще всего для этого используют сравнение аминокислотных последовательностей транслированного генома с ортологом ожидаемого белка из метаболического пути. Важно подобрать ортолог таким образом, чтобы вероятность обнаружения целевого белка была высокой, то есть выбирать либо белок из близкого организма, либо белок с достаточно широкими функциями и, возможно, несколькими



функциональными доменами [Boddy, 2014]. Поиск можно проводить по геномам из широких и специализированных баз данных – например, GenBank, JGI или Broad-MIT.

Более надёжным методом для поиска потенциальных биосинтетических путей является использование скрытых моделей Маркова (hidden Markov models, HMMs). Скрытые модели Маркова – статистические модели, основанные на анализе множественных последовательностей, поэтому для поиска более отдалённых гомологов данный метод подходит больше, чем алгоритм попарного сравнения, используемый в BLAST и аналогичных алгоритмах [Boddy, 2014]. HMMs легли в основу многих онлайн-инструментов поиска новых метаболических путей, таких как antiSMASH [Medema и др., 2011], NP.searcher [Li и др., 2009], naPDoS [Ziemert и др., 2012], PKMiner [Kim, Yi, 2012] (подходит только для поиска поликетидсинтаз II типа) и SMURF [Khaldi и др., 2010] (анализирует только геномы грибов). Также скрытые Марковские модели вошли в программы, доступные для скачивания, например, CLUSEAn [Weber и др., 2009] и ClustScan [Starcevic и др., 2008]. Используя отдельные программы или их комбинации, исследователи могут проанализировать большие объёмы последовательностей ДНК и с высокой вероятностью и достоверностью обнаружить новые биосинтетические пути.

На следующем этапе возникает задача идентифицировать все необходимые гены для функционирования метаболического пути, поскольку зачастую в него входит большое количество ферментных звеньев. Например, для синтеза поликетидов или нерибосомальных пептидов необходим набор ферментов, включающий в себя как непосредственно ПКС или НРПС, так и вспомогательные ферменты для окисления, метилирования и гликозилирования субстрата. Кроме того, необходимо обнаружить гены биосинтеза составных частей, например, стартовых соединений или активированных сахаров. К счастью для исследователей, эти гены зачастую объединены в кластеры, что упрощает их поиск, однако ставит дополнительную задачу правильно определить границы для каждого конкретного кластера. В случае исследования единичного кластера обычно возможно решить эту задачу вручную, однако в случае анализа большого количества потенциальных кластеров необходимо прибегать к автоматизированной расстановке границ кластеров. Разные алгоритмы предлагают разные решения: например, для кластеров генов вокруг ПКС или НРПС алгоритм antiSMASH объединяет в кластер гены, расположенные на расстоянии 10 тыс. п.о. друг от друга, и продлевает границы на 20 тыс. п.о. относительно крайних генов; алгоритм NP.searcher ограничивает кластеры радиусом 15 тысяч п.о. вокруг ПКС

и НРПС; алгоритм SMURF измеряет расстояние не в тысячах п.о., а непосредственно в генах и включает в кластер по 20 генов по обе стороны от ПКС или НРПС [Boddy, 2014]. Такие на первый взгляд избыточные границы позволяют предполагать, что все необходимые гены будут включены в состав описываемого кластера.

К сожалению, автоматическое определение границ на основании расстояний не помогает в определении состава суперкластеров, которые могут представлять собой генные островки, разделённые большими расстояниями и генами с другими функциями [Boddy, 2014].

После обнаружения потенциальных метаболических кластеров необходимо выбрать из них наиболее перспективные для экспериментального изучения. В таком случае приоритет обычно отдаётся кластерам, содержащим гены, наименее похожие на уже изученные, поскольку в этом случае больше вероятность, что этот метаболический путь отвечает за биосинтез неизвестного соединения [Boddy, 2014]. Для решения этой задачи с некоторыми ограничениями подходит алгоритм BLASTn: например, используя в качестве последовательности сравнения кластер биосинтеза окситетрациклина из *Streptomyces rimosus*, можно предсказать кластеры генов метаболических путей других антибиотиков, в частности, хлоротетрациклина и дактилоциклина [Boddy, 2014]. Однако при анализе разорванных кластеров (например, гены биосинтетического пути пердерина расположены в трёх разных геномных регионах) точность анализа снижается настолько, что алгоритм не способен выровнять кластеры генов, использующие в качестве субстрата одни и те же метаболиты [Boddy, 2014]. Похожая проблема возникает и при сравнении генетических последовательностей из организмов с очень разной степенью GC-обогащения ДНК. Следует отметить, что в каждом из случаев проблема решается переходом от анализа нуклеотидных последовательностей к анализу аминокислотных (например, BLASTp анализ).

Ещё более удобными являются специализированные алгоритмы ClusterBlast и Subcluster Blast из antiSMASH, направленные на поиск новых кластеров с помощью выравнивания с уже описанными [Boddy, 2014]. Другой перспективной категорией алгоритмов поиска является филогенетический анализ, для которого также разработаны соответствующие инструменты, например, платформа Phylogeny.fr, которая позволяет выравнивать множественные последовательности и строить филогенетические деревья [Boddy, 2014].

В случае исследования кластеров ПКС или НРПС вдобавок необходимо определить коровое соединение (исходный метаболит, выступающий субстратом для метаболического пути), что является очень сложной биоинформатической задачей. В подавляющем большинстве случаев автоматическое определение оказывается крайне недостоверным, хотя вручную иногда возможно решить эту задачу [Boddy, 2014]. В целом, предсказания субстрата для НРПС более точны, чем для ПКС. Если удалось определить исходный субстрат, то определение следующих интермедиатов упрощается благодаря правилу коллинеарности: последовательность превращений, происходящих с субстратом, задана последовательностью генов в соответствующем кластере [Callahan и др., 2009]. Впрочем, всегда стоит учитывать, что правило коллинеарности не является абсолютным для метаболических путей ПКС и НРПС [Boddy, 2014].

Дополнительной сложностью в предсказании продукта биосинтетического пути поликетидов и нерибосомальных пептидов является то, что продукты этих путей представляют собой соединения со сложным стереохимическим строением, поэтому даже зная путь превращений, сложно предугадать, какой из теоретически возможных изомеров синтезируется при катализе именно этими ферментами [Boddy, 2014]. Тем не менее, на основании анализа известных метаболических путей удалось выявить некоторые закономерности, в частности, С-домены НРПС отвечают за образование связи между альфа-углеродом акцепторной аминокислоты и азотом донорной пептидильной группы, а филогенетический анализ помогает достаточно точно определить донорный субстрат этих доменов [Rausch и др., 2007]. Множественные выравнивания ПКС позволили определить кеторедуктазные домены типов А и В, которые отвечают за синтез стереоизомерных 3D и 3L спиртов, соответственно [Reid и др., 2003]. Однако, как и во всех случаях с биоинформатическими предсказаниями, существует очень много исключений из описанных правил, а для ПКС II типа из грибов пока вообще не существует моделей для предсказания стереоспецифичности [Boddy, 2014].

Если исследователю удалось преодолеть трудности предыдущих этапов и с большой степенью уверенности предсказать структуру возможного продукта метаболического кластера, то можно переходить к заключительному этапу работы: сверить данную структуру с базами данных химических соединений, например, PubChem или NORINE, и обнаружить аналоги предсказанных веществ, что позволит спланировать поиск следующих метаболических кластеров, чьи последовательности, возможно, пока неизвестны [Boddy, 2014].

В целом, подход разработки геномов в настоящее время не выглядит очень надёжным, однако активно развивается и отдельные инструменты, такие как платформа antiSMASH, уже упрощают планирование экспериментальной работы, которая по-прежнему остаётся важной для подтверждения биоинформатических результатов.

## **1.6 Оптимизация работы гетерологического метаболического пути**

Такое серьёзное вмешательство в жизнь организма-хозяина, как добавление чужеродного метаболического пути, чаще всего сказывается на нём негативно. Поэтому после выбора биосинтетического пути, создания подходящей генетической конструкции и трансформации гетерологического хозяина наступает самый сложный этап в конструировании идеального штамма-продуцента, а именно оптимизация работы гетерологического метаболического пути. Чаще всего, в длинных метаболических путях существует 1-2 стадии, которые являются лимитирующими шагами в цепочке превращений (бутылочное горлышко, *bottleneck*). Именно идентификация лимитирующих стадий и их оптимизация способны оказать максимальное положительное влияние на гетерологический путь в целом, однако является непростой задачей, поскольку зависит от многочисленных особенностей организма-хозяина, а также его физиологического состояния [Luo и др., 2015].

Оптимизация гетерологической экспрессии может происходить разными способами. В частности, к ним относятся увеличение копийности генов, изменения в последовательностях регуляции трансляции, пост-трансляционные модификации и белковая инженерия. Отдельные ферменты могут быть объединены в слитые белки для выполнения сразу нескольких этапов из метаболического пути одним белком. Кроме того, белки одного биохимического пути могут быть помещены в один и тот же компартмент для увеличения локальной концентрации метаболитов [Luo и др., 2015].

### **1.6.1 Биоинформатическое предсказание перспективных методов**

#### **оптимизации**

Как и во многих других областях биологических наук, большую помощь оказывают биоинформатические методы: расчёты *in silico* позволяют подобрать наиболее перспективные подходы к улучшению экспрессии гетерологического пути без лишних затрат ресурсов на экспериментальную работу. Прекрасным примером

является создание кинетической модели гетерологического мевалонатного пути в *E. coli* на основе обыкновенных дифференциальных уравнений [Weaver и др., 2015]. Кинетические модели позволяют изменять уровни экспрессии генов метаболического пути *in silico* и наблюдать, какое влияние эти изменения оказывают на метаболические потоки. К сожалению, кинетические модели ограниченно применимы для многих экспериментальных систем из-за недостатка известных параметров (скорости реакций, концентрации ферментов и т.д.), а также из-за того, что эти параметры, определённые для реакций *in vitro* могут не соответствовать параметрам тех же реакций *in vivo* [Weaver и др., 2015]. Несмотря на указанные ограничения, авторам этой работы удалось создать кинетическую модель гетерологического мевалонатного пути с хорошими предсказательными возможностями: они определили, что лимитирующим шагом является экспрессия гена аморфадиевсинтазы (ADS), а уровень экспрессии гена мевалонаткиназы, наоборот, не оказывает влияния на общий поток метаболитов. Сконструированные на базе этих предсказаний штаммы с увеличенной экспрессией ADS и с гомологом мевалонаткиназы с меньшей константой ингибирования продуктом полностью обеспечивали уровень гетерологического биосинтеза аморфадиев, согласующийся с предсказаниями [Weaver и др., 2015].

Более широким подходом является создание метаболических моделей целых организмов [Рейн и др., 2018]. Помимо фундаментальной ценности данные модели позволяют предсказать доступность и количество определённых метаболитов, что, в свою очередь, помогает подобрать оптимальное сочетание хозяина и гетерологического метаболического пути.

### **1.6.2 Явление ингибирования продуктом и преодоление этой проблемы**

В целом, явление ингибирования фермента продуктом собственной реакции распространено достаточно широко и может оказать негативное влияние на экспрессию гетерологического метаболического пути. Иногда в одном метаболическом пути может встретиться сразу несколько ферментов, ингибируемых собственными продуктами, что значительно замедляет скорости биосинтеза и снижает конечный выход целевого метаболита. Например, у *E. coli* ароматическая аминокислота тирозин входит в состав белка TyrR (тирозиновый репрессор), экспрессия гена которого увеличивается в случае высокого уровня биосинтеза тирозина. TyrR ингибирует ферменты биосинтеза ароматических аминокислот (aroF, aroG, tyrA и tyrB) [Pittard и др., 2015].

др., 2005]. Этот механизм контроля может быть преодолен благодаря удалению гена *tyrR* из генома хозяина или помещению генов биосинтеза ароматических аминокислот под промоторы, нечувствительные к TyrR [Bongaerts и др., 2001]. Проблема ингибирования тирозином ферментов его биосинтеза присутствует и в другом популярном гетерологическом хозяине – *S. cerevisiae* [Rodrigues и др., 2015]. В целом, проблема ингибирования конечным продуктом решается заменой ферментов, подверженных данному ингибированию, на мутантные формы или аллельные варианты, у которых данное ингибирование отсутствует [Rodrigues и др., 2015; Weaver и др., 2015].

### 1.6.3 Токсическое влияние вторичных метаболитов

После введения нового метаболического пути в организм-хозяин, физиологическое состояние последнего может ухудшиться из-за накопления большого количества чужеродных метаболитов [Luo и др., 2016]. Если токсическим эффектом обладают интермедиаты, а не целевой продукт, то негативное влияние на организм хозяина может быть скомпенсировано динамически регулируемые промоторами. Например, малонил-КоА в больших количествах токсичен для клеток, поэтому была создана петля обратной связи с участием промоторов, чувствительных к малонил-КоА, и *lacI-T7* промоторов: избыток малонил-КоА запускал экспрессию *lacI*, что снижало уровень экспрессии ацетил-КоА-карбоксилазы и, как следствие, уменьшало количество малонил-КоА [Liu D. и др., 2015]. Другое важное КоА-производное – ацетил-КоА – в анаэробных условиях превращается в клетках в ацетат, который в больших количествах также обладает токсическим эффектом. При увеличении экспрессии путей ассимиляции ацетата можно одновременно достичь двух целей: снизить накопление токсичного интермедиата и повысить выход целевого вещества [Rodrigues и др., 2015].

Также для снижения влияния токсических метаболитов может быть использован подход адаптивной эволюции (постепенное приобретение штаммом-продуцентом устойчивости к определённому метаболиту при его постоянном давлении), рекомендации по осуществлению которого можно найти в [Winkler и др., 2013].

Однако даже в случае токсического эффекта конечного продукта, существуют способы обезопасить от него гетерологического хозяина. Если биосинтез соединения с антибиотическим действием закодирован в геноме бактерии, то, чаще всего, в этом же кластере есть и ген устойчивости к данному антибиотику. Например, экспрессия гена

альбицидиновой помпы (*AlbXIV*) в гетерологическом хозяине *Xanthomonas axonopodis* увеличила его устойчивость к этому антибиотику и позволила повысить продукцию альбицидина в шесть раз [Vivien и др., 2007]. Однако в небольших количествах продукция токсического целевого соединения в гетерологическом хозяине возможна даже тогда, когда у него нет никаких механизмов устойчивости. В ряде случаев, жертва уровнем выхода продукта ради сохранения жизнеспособности хозяина – это единственное возможное решение проблемы [Stevens и др., 2013b, Amiri и др., 2016].

#### 1.6.4 Оптимизация регуляторных последовательностей

Проблемы с гетерологическим биосинтезом соединений могут быть также вызваны использованием неоптимальных регуляторных последовательностей (промоторы, сайты посадки рибосом и т.д.). Регуляторные последовательности можно выбрать из библиотеки природных последовательностей или синтетических, основанных на усреднении последовательностей сильных регуляторных последовательностей [Siegl и др., 2013]. Возможны различные подходы к выбору промоторов в случае внедрения нескольких гетерологических генов: например, можно использовать разные индуцируемые промоторы, чтобы по отдельности регулировать экспрессию каждого из генов; можно использовать промоторы, узнаваемые гетерологической РНК-полимеразой при одновременном введении в геном её гена; можно сгруппировать гетерологические гены в один оперон, чтобы использовать одинаковые промоторы и одновременно регулировать экспрессию всех генов метаболического пути [Rodrigues и др., 2015]. Изменение сайтов связывания рибосом на более сильные у генов, кодирующих ферменты, которые лимитируют весь путь, также может способствовать улучшению системы в целом - например, такой подход позволил в пять раз увеличить продукцию аморфадина и попутно снизить токсический эффект промежуточных продуктов [Nowroozi и др., 2014]

В целом, существует два подхода к использованию промоторов для увеличения экспрессии гетерологических генов: замена исходных промоторов на промоторы, эффективно распознаваемые хозяином, и улучшение узнавания хозяином нативных промоторов [Stevens и др., 2013b, Ryan и др., 2013]. В качестве иллюстрации второго подхода можно привести следующий пример: в 70% всех генов бактериальных биосинтетических путей поликетидов и нерибосомальных пептидов присутствуют промоторы, распознаваемые альтернативным транскрипционным фактором  $\sigma^{54}$ . Для

гетерологической экспрессии таких путей в *E. coli* напрямую и положительно повлияла избыточная экспрессия гена самого этого фактора, что было показано на примере окситетрациклинового кластера из *Streptomyces rimosus* [Stevens и др., 2013a].

В ряде случаев, когда хозяин не способен распознать нативные промоторы биосинтетического пути, требуется их замена. В более простом случае, когда весь биосинтетический кластер представляет собой моноцистронный оперон, достаточно поставить один промотор выше перед всеми генами, однако это подходит не для всех хозяев и не во всех случаях. Иногда для достоверной экспрессии всех генов кластера необходимо заменить промоторы для каждого из них [Stevens и др., 2013b].

Для многих модельных объектов известны сильные конститутивные или индуцируемые промоторы. В частности, к ним относятся actI/actIII, ermE и tirA для *Streptomyces*, T7, Pm и Tet для грам-отрицательных бактерий (например, *E. coli*) [Stevens и др., 2013b].

Благодаря использованию промоторов различной силы также может быть достигнута регуляция соотношений ферментов метаболического пути [Луо и др., 2015]. Самым простым вариантом для исследователей является необходимость достичь эквимольного соотношения ферментов: эту задачу можно решить, создав слитый белок с возможностью его ко- или посттрансляционного разрезания. Подобное разрезание может осуществляться с помощью 2a-пептидов пикорнавирусов [Kim и др., 2011], LP4-пептидов (“linker peptide 4”) [François и др., 2002] и последовательностей узнавания протеазы вируса гравировки табака (Tobacco Etch Virus, TEV) [Kapust, Waugh, 2000]. Примером стехиометрического получения белков в виде продуктов разрезания слитого белка может служить работа [Yang J. и др., 2018], в которой удалось получить эквимольное количество всех белков системы фиксации азота в *E. coli*.

Более сложной задачей является создание экспрессируемых белков в неравных соотношениях. Интересной находкой исследователей, разработавших штамм для синтеза скулерина и его ближайших производных, был подбор силы промотора для каждого гена, кодирующего ферменты соответствующего метаболического пути: сначала для каждого из гетерологических генов использовался промотор, регулируемый концентрацией галактозы (pGAL-10), а после определения необходимого уровня экспрессии происходила замена на промотор подходящей силы [Hawkins, Smolke, 2008].



Альтернативным способом подбора промотора необходимой силы является подход COMPACTER (“customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering”), реализованный в дрожжах *S. cerevisiae* для метаболических путей утилизации целлобиозы и ксилозы [Du и др., 2012; Yuan и др., 2013]. Исследователи создали наборы промоторов с заменами, влияющими на их эффективность, и проверили в модельном объекте сочетания генов с промоторами разной силы для балансировки метаболического потока в различных ростовых условиях.

Сочетая кодирующие последовательности с разными промоторами, можно получать и тестировать различные соотношения белков одного и того же биохимического пути в гетерологическом хозяине. Технически подобная задача является простой благодаря технологиям Gibson assembly и Golden Gate Modular Cloning [Gibson и др., 2009; Iverson и др., 2016, Weber и др., 2011, Engler и др., 2014, Moore и др., 2016, Lee и др., 2015].

### 1.6.5 Дозирование генов

На первый взгляд может показаться, что для максимальных выходов целевого продукта необходимо внедрить как можно больше копий генов метаболического пути: тогда ферментов будет очень много и уровень биосинтеза также будет высок. Однако на самом деле закономерность не совсем такая. Действительно, до определённого уровня полезно наращивать количество копий гетерологических генов, однако при превышении определённого уровня нагрузка на организм-хозяин будет настолько велика, что отток метаболитов на гетерологический путь невозможно будет компенсировать [Yang, Zhang, 2018a]. Например, при производстве рекомбинантного предшественника инсулина в клетках дрожжей наибольший выход продукта наблюдался при внедрении 12 копий соответствующего гена в геном дрожжей, а при введении большего числа копий наблюдался окислительный стресс и катастрофическое снижение количества доступного углерода, что негативно сказывалось на росте дрожжей [Zhu и др., 2011].

Кроме того, повышение количества рабочего фермента важно скорее для лимитирующих стадий, чем для всех стадий вообще. Например, при гетерологическом биосинтезе абсцизовой кислоты в дрожжах *S. cerevisiae* увеличение копий генов *bcaba1* или *bcaba3* приводило к значительному увеличению выхода продукта, тогда

как увеличение копий гена *bcaba2* увеличивало выход незначительно, а увеличение копий *bcaba4* не влияло вообще [Otto и др., 2019].

### 1.6.6 Технологии искусственного отбора

Для улучшения биосинтеза целевого метаболита широко применяется подход положительного отбора клонов, более эффективно производящих данное соединение. Такой отбор можно осуществить благодаря добавлению антибиотиков к штамму-продуценту: преимущество в таких условиях получают клетки, обладающие устойчивостью к антибиотику, а это свойство может быть одновременно полезным и для гетерологического биосинтеза необходимого вещества [Ongley S.E. и др., 2013]. Также отбор может быть осуществлён по увеличению устойчивости к самому метаболиту, если последний обладает токсическим действием. Примером данного подхода может быть адаптивная эволюция дрожжей *S. cerevisiae* по отношению к гетерологически вырабатываемым ими каротиноидам [Reyes, Kao, 2018].

### 1.6.7 Распределение потока метаболитов и доступность субстратов

Важным для оптимального функционирования гетерологического пути является доступность субстратов для этого пути. В целом метаболические потоки в организме определяются с помощью анализа метаболических потоков (metabolic flux analysis, MFA), который может быть основан на методах масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии и других метаболомных подходов [Yang, Zhang, 2018a; Peña и др., 2018].

После проведения MFA можно проанализировать наиболее критические места и начать оптимизировать метаболические потоки. Для оптимального перераспределения потока метаболитов в сторону гетерологического пути одним из самых простых подходов является изменение уровня экспрессии генов-участников как гетерологических, так и нативных метаболических путей [Luo и др., 2015]. Благодаря этому подходу можно достичь сразу трёх целей: увеличить производство конкретного необходимого субстрата, увеличить общий поток метаболитов по данному пути, снизить или исключить отток метаболитов на конкурирующие пути. Для этого выбирается метаболит, стоящий на пересечении биохимических путей как самого организма-хозяина, так и гетерологических, и определяется круг взаимодействующих с ним ферментов. Уровень ферментов, направляющих данный метаболит по целевому

гетерологическому пути, увеличивают благодаря избирательному увеличению экспрессии, а уровень ферментов, участвующих в конкурирующих метаболических путях, снижают. Например, благодаря подобному подходу удалось увеличить уровень гетерологического биосинтеза альфа-сантолена [Chen Y. и др., 2013] и н-бутанола [Lian и др., 2014], изменив соотношение ферментов, взаимодействующих с ацетил-КоА.

Зачастую сложно однозначно интерпретировать ухудшение метаболического состояния хозяина при внедрении гетерологических метаболических путей. Сходная симптоматика может в равной степени обозначать как накопление токсического метаболита, так и изменение метаболических потоков в ущерб первичному метаболизму организма хозяина, а в некоторых случаях и оба данных влияния одновременно [Kram и др., 2015]. Угнетение первичного метаболизма наблюдалось при экспрессии в *Arabidopsis* и *S. lycopersicum* генов ферментов биосинтеза терпеноидов, таких как таксадиенсинтаза (TXS), линалоол/неролидолсинтаза (FaNES1), фитоенсинтаза (PSY) или гераниолсинтаза (GES) [Kram и др., 2015].

Доступность прекурсоров для синтеза целевого конечного соединения крайне важна для общей эффективности гетерологического метаболического пути. В ряде случаев необходимые соединения могут быть добавлены в ростовую среду, однако не всегда это является удобным (например, эти соединения могут плохо проникать через плазматическую мембрану или клеточную стенку, плохо растворяться или быстро разлагаться в водных растворах). В таком случае гораздо эффективнее будет самостоятельный биосинтез хозяином данных прекурсоров из более доступных соединений, например, из первичных метаболитов [Rodriguez и др., 2009].

В некоторых случаях даже при наличии всех необходимых субстратов для запуска гетерологического пути, может наблюдаться нулевая продукция целевого соединения. Это может означать, что все эти интермедиаты расходуются на нужды клетки-хозяина, и их не хватает для гетерологического метаболического пути. В таком случае потребуется ввести дополнительно участок биосинтетического пути, пусть и дублирующий собственный путь хозяина, зато позволяющий добиться более высоких концентраций субстрата. Например, гетерологическая экспрессия в *E. coli* гена  $\beta$ -фелландренсинтазы из *Lavandula angustifolia* ни сама по себе, ни в комбинации с геном геранилдифосфатсинтазы из *Picea abies* не привела к биосинтезу  $\beta$ -фелландрена, тогда как этих генов было достаточно для продукции  $\beta$ -фелландрена в цианобактериях. Проблема решилась добавлением гетерологического мевалонатного пути, что сместило поток метаболитов в сторону изопреноидных предшественников целевого продукта

(изопентенилдифосфата и диметиаллилдифосфата), которые, в свою очередь были преобразованы в  $\beta$ -фелландрен, общий выход которого составил в разных условиях от 5,7 до 11 мг на 1 г сухой массы клеток [Formighieri, Melis, 2014].

При гетерологической экспрессии метаболических путей важным является контроль биосинтеза промежуточных и целевых метаболитов [Luo и др., 2015]. Это может потребоваться для оценки как эффективности подхода, так и жизнеспособности организма-хозяина, поскольку эти метаболиты могут обладать по отношению к нему токсичностью. В целом, методы контроля делятся на те, которые проводятся в режиме реального времени (on-line), и те, которые проводятся с задержкой (off-line) [Yang, Zhang, 2018a]. Ко второму типу относятся трудоёмкие методы газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии, тогда как on-line методы включают в себя автоматическое определение метаболитов по характеристикам ростовой среды и культуральной суспензии [Yang, Zhang, 2018a]. Одними из самых популярных on-line методов являются ближнеинфракрасная (near infrared, NIR), средне-инфракрасная (mid-infrared, MIR) и средне-инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (Fourier transform mid-Infrared spectroscopy, FTIR) [Yang, Zhang, 2018a]. Также для определения уровня биосинтеза могут использоваться биосенсоры, например, репортерные гены, находящиеся под чувствительными к данному метаболиту промоторами. Кроме того, под этими промоторами также могут находиться гены обратной регуляции производства целевого метаболита, что обеспечивает динамическое равновесие между производством необходимого вещества и приемлемыми условиями для выживания организма-хозяина [Dahl и др., 2013].

Часто применяется мониторинг прироста биомассы, который может определяться с помощью методов диэлектрической спектроскопии, определения оптической плотности, инфракрасной и флуоресцентной спектроскопии [Kiviharju и др., 2008]. Методы FTIR и NIR также применимы для этого, но имеют ограничения при высоких плотностях культур [Yang, Zhang, 2018a]. Мониторинг прироста биомассы также доступен как в on-line варианте, так и с помощью отбора проб.

### 1.6.8 Редактирование генома для оптимизации экспрессии гетерологических путей

Масштабное вмешательство в метаболические пути организма-хозяина зачастую недостижимо такими методами генной инженерии, как трансформация плазмидной и даже космидной ДНК, однако разработаны методы геномного и транскриптомного редактирования, позволяющие добиваться высокоэффективных изменений в метаболических потоках. Например, успешный биосинтез каротиноида ликопина был достигнут благодаря внесению изменений в 24 гена соответствующего метаболического пути *E. coli* [Wang и др., 2009]. Подобные изменения стали технологически просты благодаря внедрению методов РНК-интерференции [Si и др., 2015], белков с доменами, узнающими определённые последовательности ДНК (цинковые пальцы, TAL-домены) [Miller и др., 2007] и, конечно же, технологии CRISPR-Cas9 [Peña и др., 2018]. Например, на основе принципа CRISPR-Cas9 разработана методика для быстрого и высокоэффективного внедрения метаболических кластеров в геном бактерий [Bassalo и др., 2016]. Также полезным методом в метаболической инженерии является синтез геномов, пока получивший распространение лишь для простых геномов (вирусные и бактериальные). Для дрожжей синтез новых геномов осуществляется «переписыванием» старых геномов с помощью многочисленных рекомбинаций и дальнейшего отбора жизнеспособных вариантов [Dymond и др., 2011].

Стоит отметить, что отдельной проблемой является инактивация или избавление хозяев от гетерологических генов [Туо и др., 2009]. Во избежание таких ситуаций разрабатываются штаммы с отредактированными геномами, из которых убраны последовательности мобильных генетических элементов, гены интегразы, повреждённые гены, а также гены с неизвестными функциями [Rodrigues и др., 2015]. Подобные изменения улучшают экспрессию гетерологических метаболических путей, а в ряде случаев даже увеличивают эффективность трансформации и точность воспроизведения чужеродной ДНК [Sharma и др., 2007].

### 1.6.9 Преодоление проблемы недостатка кофакторов и малых органических субстратов

Важно понимать, что помимо интермедиатов, подвергающихся череде превращений, в реакции прямо или косвенно участвуют различные кофакторы (например, NADH, NADPH, FADH<sub>2</sub>) и простые органические соединения, которые присоединяются к метаболитам в ходе биосинтеза более сложного соединения. Лимитирующим фактором может стать нехватка именно этих соединений, поэтому необходимо, чтобы гетерологический хозяин вырабатывал их в достаточном количестве. Частым участником биосинтетических путей являются КоА-производные простых органических кислот (ацетил-КоА, малонил-КоА и т.д.). Улучшить функционирование гетерологического метаболического пути можно путём добавления в организм-хозяин ферментов, производящих эти соединения, а именно, ацетил-КоА-карбоксилазу (ACC), которая катализирует превращение эндогенного ацетил-КоА в малонил-КоА, или белок-переносчик дикарбоксилатов (MatC) и малонил-КоА-синтетазу (MatB), которые, соответственно, транспортируют в клетку малонат, добавленный в среду, и превращают его в малонил-КоА [Malla и др., 2012; Rodriguez и др., 2009; Rodrigues и др., 2015]. При использовании гетерологической ацетил-КоА-карбоксилазы надо помнить, что для функционирования этого фермента ему нужна посттрансляционная модификация биотинилирования, которая осуществляется биотинлигазой (BLP). В случае отсутствия у выбранного хозяина биотинлигазы необходимо гетерологически ввести её ген [Rodrigues и др., 2015].

При гетерологическом биосинтезе жирных кислот хозяину зачастую может не хватать ацетил-КоА и NADPH. Проблема может быть решена следующими способами: в геном гетерологического хозяина можно внедрить гены пути метаболизирования этанола или гены фосфокетотазного пути, продуктами которых являются ацетил-КоА и NADPH [de Jong и др., 2014].

Похожим образом улучшение функционирования пути биосинтеза этилмалонил-КоА позволило создать штамм *Streptomyces venezuelae* для гетерологического производства поликетидов: авторы идентифицировали и функционально охарактеризовали путь биосинтеза этилмалонил-КоА в данном организме, а затем удалили из генома *S. venezuelae* ген *meaA*, кодирующий коэнзим-В<sub>12</sub>-зависимую этилмалонил-КоА-мутазу, добавили этилмалонат в питательную среду и повысили экспрессию гетерологического гена тилозиновой ПКС благодаря

избыточной экспрессии специфичного регуляторного гена *pikD*. В результате гетерологический биосинтез тилактона увеличился примерно на порядок [Jung и др., 2014].

В случае гетерологического биосинтеза поликетидов в *E. coli* похожий подход также принёс плоды. При разработке штамма для производства 6-деоксиэритронолида В основной упор был сделан не на введении гена ПКС, ответственного за биосинтез этого соединения, а на избыточной экспрессии трёх метаболических путей, производящих субстраты для биосинтеза этого поликетиды: один путь биосинтеза (2S)-метилмалонил-КоА и два пути биосинтеза пропионил-КоА. Кроме того, важными для увеличения титра 6-деоксиэритронолида В оказались удаление гена пропионил-КоА:сукцинат КоА-трансферазы (*ygfH*), избыточная экспрессия транскрипционного активатора захвата коротких жирных кислот, добавление экзогенного метилмалоната, экспрессия метилмалонил-КоА-эпимеразы из *Streptomyces coelicolor* A3(2) в сочетании с избыточной экспрессией нативной метилмалонил-КоА-мутаза *E. coli* и добавлением экзогенного сукцината [Boghigian и др., 2011]. Подобный результат в очередной раз показывает, что для оптимального гетерологического биосинтеза важен комплексный подход к улучшению этого процесса.

#### 1.6.10 Проблема различного GC-состава генов и предпочтения кодонов

Объективная проблема непосредственного использования генов из одних организмов в других заключается в том, что у источников генов и потенциальных гетерологических хозяев может значительно отличаться GC-состав генов и предпочтения в использовании кодонов [Stevens и др., 2013b]. Поэтому для улучшения гетерологической экспрессии необходимо анализировать использование кодонов у организма хозяина и оптимизировать кодонный состав генов [Lussier и др., 2013]. Это возможно либо сайт-направленным мутагенезом, если требуется заменить небольшое число редких кодонов, либо с помощью химического синтеза искусственных генетических последовательностей с кодонным составом, нормализованным для определённого хозяина (доступно для заказа, например, в фирмах Twist Bioscience <https://www.twistbioscience.com/> и IDT <https://eu.idtdna.com/pages>). В качестве альтернативы, можно вводить в геном хозяина гены редких тРНК [Leonard и др., 2006].

### 1.6.11 Оптимизация сочетания ферментов метаболического пути

В случае, когда существуют различные ферменты с одной и той же функцией (например, ортологи из одного и того же или разных организмов), необходимо протестировать как можно больше комбинаций различных ферментов, чтобы найти среди них самое эффективное сочетание [Lussier и др., 2013]. В ряде случаев эффективной стратегией оказывается комбинирование гетерологических генов из разных метаболических путей или даже из разных организмов: например, для успешной экспрессии мевалонатного пути из *E. coli* в дрожжах *S. cerevisiae* оказалось необходимым заменить гены, кодирующие ферменты, катализирующие последние две реакции мевалонатного пути, на гены железосерного кластера *E. coli* [Carlsen и др., 2013], в случае реконструкции пути биосинтеза поликетидов руброфузарина из гриба *Fusarium graminearum* в тех же дрожжевых хозяевах потребовалось добавить ген фосфопантетеинилтрансферазы *NpgA* из *Aspergillus fumigatus* [Rugbjerg и др., 2013], а для гетерологического биосинтеза изопимаровой кислоты в *Nicotiana benthamiana* выгодным сочетанием оказались гены из индийского колеуса *Plectranthus barbatus* и серебристой ели *Picea sitchensis* [Gnanasekaran и др., 2015].

При использовании бактериальной гетерологической системы для секреции белков задействован собственный секреторный путь этих бактерий. На примере *B. subtilis* было обнаружено, что лимитирующим фактором в гетерологической секреции может являться нехватка белков бактерии-хозяина, что может быть решено увеличением экспрессии их генов. При последовательном увеличении экспрессии генов секреторного пути *B. subtilis* было обнаружено, что наибольшее влияние оказывает нехватка липопротеина PrsA и шаперона DnaK, а при увеличении экспрессии их генов продукция целевого гетерологического белка выросла до 160-170% [Chen J. и др., 2015].

Для составления длинного гетерологического метаболического пути важно объединять гены, кодирующие все необходимые ферменты, в общие генетические конструкции [Luo и др., 2015]. Благодаря современным технологиям это стало достаточно просто с помощью стратегий хранения стандартизованных частей генов и дальнейшего их объединения в необходимой последовательности (технологии Biobrick, Bglbrick, SEVA, Golden Gate) [Lee и др., 2011; Silva-Rocha и др., 2013]. Для подобных объединённых генетических конструкций важным остаётся подбор регуляторных последовательностей для увеличения уровней транскрипции и



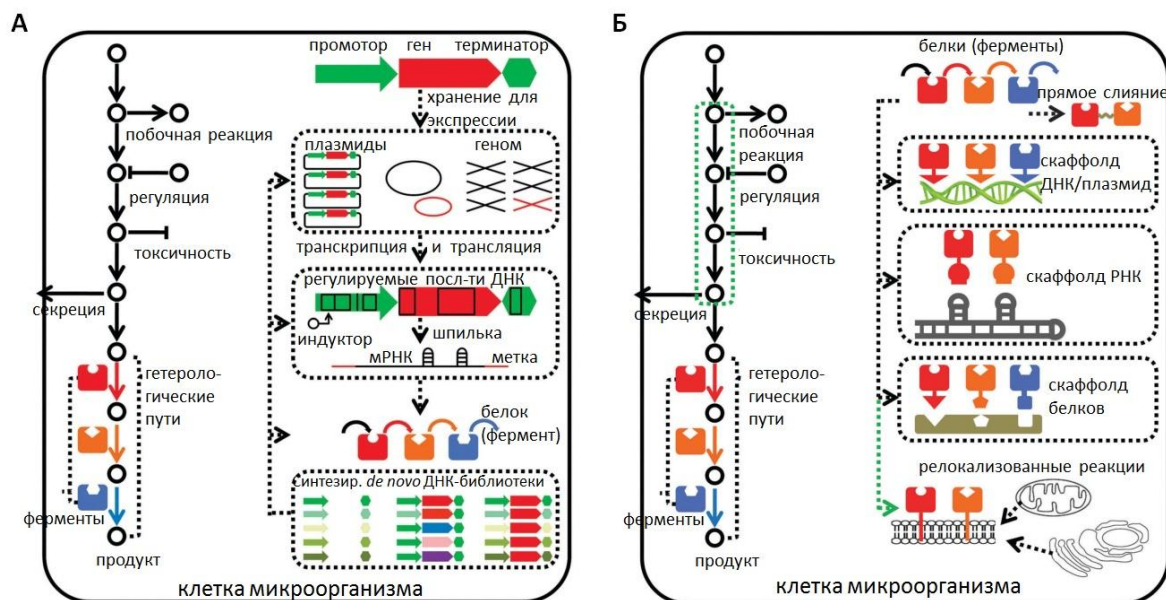
трансляции [Neumann и др., 2010]. Важным технологическим упрощением рутинных процедур молекулярного клонирования является возможность простого, безошибочного и коммерчески доступного искусственного синтеза необходимых генов: в частности, генов, которые невозможно по каким-либо причинам получить традиционными методами молекулярного клонирования (в частности, если физически отсутствует ДНК-матрица, а доступна только информация о последовательности гена на основании данных метаанализа или секвенирования генома или транскриптома) [Baeyer и др., 2009].

Создание слитых белков зачастую повышает общую эффективность гетерологического метаболического пути, поскольку помещает активные центры различных ферментов в непосредственную близость, чем способствует метаболическому потоку по целевому гетерологическому пути и меньший отток метаболитов на биохимические пути самой клетки-хозяина [Luo и др., 2015]. Основные стратегии усиления метаболических путей и оптимизации сочетания их ферментов показана на Рис. 8.

Однако сохранение правильной пространственной структуры при создании слитых белков играет ключевую роль для сохранения функции. В ряде случаев даже порядок белков при слиянии имеет значение и может оказать влияние на уровень продукции необходимого целевого метаболита [Luo и др., 2015].

Для пространственного сближения ферментов-участников метаболического пути можно также применять подход создания скаффолдов – специальных структур на основе плазмид, РНК или белков, которые взаимодействуют с целевыми белками, в результате чего образуется единая макроструктура [Luo и др., 2015]. Для взаимодействия с нуклеиновыми кислотами к ферментам целевого метаболического пути должны быть присоединены специальные мотивы, например, цинковые пальцы, а для белкового скаффолда необходимо слияние гетерологических белков с белками, для которых показано взаимодействие. Каждый из подходов создания скаффолдов имеет свои преимущества: например, плазмиды для скаффолда могут различаться по длине линкера, что позволяет регулировать расстояние между взаимодействующими ферментами, скаффолдные РНК обладают небольшим размером и при этом разнообразными структурами, а белки для скаффолда не сложно присоединить к целевым белкам стандартными молекулярно-биологическими методами. Ещё одним преимуществом скаффолдного подхода над созданием слитых белков является то, что можно регулировать соотношение ферментов метаболического пути, что позволяет

избежать накопления промежуточных метаболитов, которые могут обладать токсическим эффектом на организм-хозяин [Dueber и др., 2009]. Так или иначе, эти подходы подразумевают модификацию аминокислотной последовательности ферментов, что может сказаться на их эффективности [Dueber и др., 2009].



**Рисунок 8.** Стратегии регуляции экспрессии генов путей биосинтеза природных соединений (А) и стратегии усиления метаболического потока с помощью сближения белков-участников метаболического пути (Б). А - экспрессия гетерологических генов регулируется на уровне самих генов (изменения числа копий генов, отбор плазмид, оптимизация кодонного состава генов), на транскрипционном уровне (сила промоторов, мутирование функциональных участков промоторов, добавление сайтов активации перед промоторами, искусственные индуцибельные промоторы) и на трансляционном уровне (повторы специальных последовательностей, синтетические рибопереключатели, рациональные изменения сайта посадки рибосом, изменения межгенных последовательностей, искусственные кодоны). Б - для усиления гетерологического метаболического потока используются слитые белки с задействованием различных линкеров; для пространственного объединения ферментов, выполняющих реакции одного метаболического пути, используются скаффолды, основанные на ДНК, РНК или белках; внутриклеточное перераспределение белков также способствуют их сближению или может усиливать метаболический поток благодаря изменению локального окружения. Цветными стрелками отмечены гетерологические ферменты. Адаптировано из [Luo и др., 2015].

Ещё одним ограничением для функционирования гетерологического метаболического пути может являться то, что его ферменты имеют различную

внутриклеточную локализацию, что затрудняет доступ интермедиата к следующему ферменту [Luo и др., 2015]. В частности, некоторые ферменты могут иметь локализацию на мембране эндоплазматического ретикулума или митохондрии, причём удаление домена, ответственного за локализацию, негативно сказывается на функции этого фермента. Подобное верно для цитохромов P450, поэтому для создания гетерологических метаболических путей с участием P450 необходимо искусственно модифицировать другие ферменты для совместной локализации на мембране [Avalos и др., 2013]. Для дрожжевых хозяев разработан набор векторов для локализации одного и того же гетерологического метаболического пути в различных внутриклеточных компартментах [Avalos и др., 2013]. В случае растения в качестве гетерологического хозяина применима совместная локализация ферментов бисинтетического пути в хлоропласте [Gnanasekaran и др., 2015].

#### **1.6.12 Изменение собственных метаболических путей организма-хозяина**

Уже имеющиеся в штамме-продуценте метаболические пути могут как способствовать, так и мешать наработке целевого гетерологического соединения. В зависимости от их влияния, можно снижать их эффективность (вплоть до полного удаления путей, как описано в работе Chiang и др., 2013) либо усиливать её (например, при усилении биохимического пути формирования дисульфидных связей можно увеличить продукцию секретируемых белков [Sha и др., 2013]).

Зачастую внедрённый чужеродный метаболический путь является продолжением уже существующего пути хозяина и для увеличения выхода целевого метаболита можно проводить усиление именно существующего пути. Такое усиление может быть достигнуто введением ферментов, компенсирующих работу самых наименее продуктивных участников. Например, введение генов трёх дополнительных ферментов, катализирующих реакции превращения каротиноидов, в геном кукурузы привело к увеличению продукции зеаксантина до уровня 56 мкг/г сухой массы [Naqvi и др., 2011].

Помимо регуляции вторичного метаболизма хозяина, существуют также подходы по перераспределению потоков первичного метаболизма: в частности, к ним относится работа по “настройке” гликолиза в *E. coli* для оттока углерод-содержащих субстратов в русло биосинтеза целевого соединения [Solomon и др., 2013] и работа по

прекращению биосинтеза гликогена в *Synechococcus elongatus* для увеличения продукции гетерологического пути биосинтеза этанола [Velmurugan и др., 2020].

### 1.6.13 Оптимизация процесса культивации

В оптимизации может нуждаться также протокол выращивания штамма-продуцента. Например, для гетерологического биосинтеза фенольных соединений в бактериях часто используется двухстадийная культивация: сначала бактерии-продуценты засеваются в богатую среду LB (Luria broth, Lysogenic Broth), а после быстрого роста биомассы переносятся в минимальную среду M9, в которой уже синтезируют фенольные соединения (например, куркуминоиды) из экзогенных предшественников [Rodrigues и др., 2015]. Очевидно, что данный способ культивации приемлем для лабораторных условий, однако не очень удобен при переходе на промышленные масштабы. Поэтому важна разработка как штаммов продуцентов, так и подходящих сред для одностадийной ферментации [Santos и др., 2011].

Другой проблемой при культивации может служить то, что добавляемые предшественники (например, кофейная, кумаровая и феруловая кислоты) могут быть токсичны для продуцента. В таком случае, добавление этих субстратов стоит разбить на этапы и не вносить новую аликвоту вещества, пока продуцент не метаболизирует большую часть предыдущей [Rodrigues и др., 2015]. Данный подход является примером подпитываемой культивации (fed-batch cultivation), при которой в течение ферментации постепенно вносят какие-либо субстраты, например, указанные выше предшественники метаболитов или простые источники углерода (глюкоза, глицерин и т.д.) [Yang, Zhang, 2018a]. К потрясающим достижениям подобного способа культивации стоит отнести дрожжи *P. pastoris*, гетерологически экспрессирующие гены пути биосинтеза бутан-2,3-диола с выходом целевого продукта 45 г/л [Yang, Zhang, 2018b].

Оригинальным решением проблемы культивации организма-продуцента может быть введение в него ещё одного гетерологического метаболического пути для увеличения скорости прироста биомассы. С помощью такого подхода [Beck и др., 2020] смогли повысить на 69% оптическую плотность анаэробных бактерий *Acetobacterium woodii* при введении в них гетерологического пути деиминирования аргинина из *Clostridium autoethanogenum*, благодаря чему этот штамм можно

рекомендовать для производства в нём соединений, требующих больших количеств АТФ для биосинтеза.

В целом, подбор оптимальных условий для культивации гетерологических штаммов-продуцентов представляет собой крайне трудоёмкий и зачастую неблагоприятный процесс, поскольку исследователям надо учесть многочисленные эффекты, определить влияние непосредственно чужеродных генетических конструкций и отделить от влияния условий культивации [Looser и др., 2015].

## Глава II. Материалы и методы

### 2.1 Реактивы, буферные растворы и культуральные среды

#### 2.1.1 Реактивы для проведения билюминесцентных реакций

Кофейная кислота (Sigma Aldrich)

Гиспидин (95% чистоты, предоставлен Царьковой А. и Осиповой З.)

Оксилюциферин грибов ((2Z,5E)-6-(3,4-дигидроксифенил)-2-гидрокси-4-оксогекса-2,5-диеновая кислота) (95% чистоты, предоставлен Царьковой А. и Осиповой З.)

ДМСО (Serva)

Буфер DPBS (Gibco)

Тирозин (Serva)

Цитратный буфер: 0,072 М раствор цитрата натрия (Panreac), 0,028 М раствор HCl (Merck)

#### 2.1.2 Культуральные среды и растворы

##### 2.1.2.1 Среды для работы с бактериями *Escherichia coli* и *Agrobacterium*

###### *tumefaciens*

Жидкая среда LB: триптон (Хеликон) 10 г/л, NaCl (Химмед) 10 г/л, дрожжевой экстракт (ПанЭко) 5 г/л

Твёрдая среда LB: триптон (Хеликон) 10 г/л, NaCl (Химмед) 10 г/л, дрожжевой экстракт (ПанЭко) 5 г/л, 2% агар (VWR Life Science AMRESCO)

Жидкая среда SOB: триптон (Хеликон) 20 г/л, NaCl (Химмед) 0,5 г/л, дрожжевой экстракт (ПанЭко) 5 г/л

Жидкая среда MS-medium: соли Мурашиге-Скуга (Sigma Aldrich), витамины Мурашиге-Скуга (Sigma Aldrich), сахароза 30 г/л (Химмед), pH 5.8

Твёрдая среда MS-medium: соли Мурашиге-Скуга (Sigma Aldrich), витамины Мурашиге-Скуга (Sigma Aldrich), сахароза 30 г/л (Химмед), агар 8 г/л, pH 5.8

Буфер для инфльтрации: 10 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich), 10 mM MES pH 5.7 (Sigma Aldrich), 200 мкМ ацетосирингона (Abscam)

### 2.1.2.2 Среды для культивации дрожжей *Pichia pastoris*

Жидкая среда YPD: 2% пептон (VWR Life Science AMRESCO), 1% дрожжевой экстракт (ПанЭко), 2 % глюкоза (Диаэм)

Жидкая среда YPD с кофейной кислотой (Sigma Aldrich)

Жидкая среда YPD с тирозином (Serva)

Твёрдая среда YPD: 2% пептон (VWR Life Science AMRESCO), 1% дрожжевой экстракт (ПанЭко), 2 % глюкоза (Диаэм), 2% агар (VWR Life Science AMRESCO)

Твёрдая среда YPDS: 1 М сорбитол (AppliChem), 2% пептон (VWR Life Science AMRESCO), 1% дрожжевой экстракт (ПанЭко), 2 % глюкоза (Диаэм), 2% агар (VWR Life Science AMRESCO)

Жидкая среда YPD с DTT и HEPES: 2% пептон (VWR Life Science AMRESCO), 1% дрожжевой экстракт (ПанЭко), 2 % глюкоза (Диаэм), 167 мМ HEPES (ПанЭко), 21мМ DTT (Merck)

Твёрдая среда RDB: 1 М сорбитол (AppliChem), 2% глюкоза (Диаэм), 1.34 % основа азотного агара для дрожжей (YNB) (Merck), 0.005 % незаменимые аминокислоты (Merck), 0.00004 % биотин (Merck), 2 % агар (VWR Life Science AMRESCO)

Сорбитол: 1 М сорбитол (AppliChem)

### 2.1.2.3 Среды и растворы для работы с клетками млекопитающих

#### HEK293NT

Жидкая среда full DMEM: DMEM (ПанЭко), 10% фетальная телячья сыворотка (ПанЭко), смесь пенициллин-стрептомицин (ПанЭко)

Раствор трипсин-Версен: раствор Версена (ПанЭко), 0,25% трипсин (ПанЭко)

Жидкая среда DMEM, насыщенный тирозином (Serva)

Жидкая среда IMEM: MEM M3024 (Sigma Aldrich), HEPES 20 мМ (ПанЭко)

Жидкая среда IMEM, насыщенный тирозином (Serva)

Трансфекционный агент - Трансфектин (Унифектин-56)

Жидкая среда Opti-MEM (Gibco)

## **2.2 Оборудование**

### **2.2.1 Оборудование для работы с нуклеиновыми кислотами**

Настольная центрифуга MiniSpin (Eppendorf)

Твердотельный термостат Термит (ДНК-технология)

Амплификаторы Veriti (Applied Biosystems) и 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Камера для горизонтального электрофореза (Bio-Rad)

Источник постоянного тока для электрофореза (Bio-Rad)

Имиджер для гель-документации (Bio-Rad)

### **2.2.2. Оборудование для работы с бактериями и дрожжами**

Шейкер-инкубатор Excella 24R (New Brunswick)

Термостатируемый шкаф BAXTER IC-83 (SCIENTIFIC PRODUCTS)

Термостатируемый шкаф BD-23 (Binder)

Электропоратор MicroPulser (Bio-Rad)

Ламинарный шкаф EUROPEENNE (ESI Flufrance)

### **2.2.3 Оборудование для работы с культурами клеток млекопитающих**

#### **HEK293NT**

CO<sub>2</sub>-инкубатор (Servo Enterprises)

Ламинарный шкаф БОВ-001-АМС вариант СЛШ (АМС).

ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad)

### **2.2.4 Оборудование для регистрации люминесценции**

IVIS Spectrum CT (Perkin-Elmer)

Fusion Pulse.7 (Vilber Lourmat)

Люминометр GloMAX-Pro (Promega)



### **2.3 Штаммы и линии, использованные в работе**

*Escherichia coli* XL1-blue

*Agrobacterium tumefaciens* AGL0

*Pichia pastoris* GS115

*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1

*Nicotiana benthamiana*

HEK293NT (модифицированная линия клеток почки эмбриона человека)

### **2.4 Протоколы экспериментов**

#### **2.4.1 Методы генной инженерии**

##### **2.4.1.1 Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий**

Для выделения плазмидной ДНК из клеток бактерий, частью биомассы отобранной колонии, содержащей рекомбинантную плазмиду, инокулировали 4 мл среды LB с селективным антибиотиком и инкубировали в стеклянной или пластиковой пробирке объемом 10-15 мл при 37°C в течение 12-16 ч при интенсивном перемешивании в термостатируемом шейкере. Выделение плазмидной ДНК проводилось с использованием коммерческого набора для выделения ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя.

##### **2.4.1.2 Экстракция ДНК из агарозного геля после электрофоретического разделения**

Экстракцию ДНК из агарозного геля после электрофоретического разделения проводили с помощью коммерческого набора Cleanup Standart (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя.

##### **2.4.1.3 Секвенирование ДНК по методу Сэнгера**

Определение последовательности фрагментов ДНК производилось по методу Сенгера компанией Евроген (Россия).

#### **2.4.1.4 Высокопроизводительное секвенирование Illumina**

Определение последовательности фрагментов ДНК и сборка протяжённых последовательностей проводились с помощью метода Hi-Seq Illumina на базе Лаборатории эволюционной геномики ФББ МГУ.

#### **2.4.1.5 Реакции рестрикции и лигирования ДНК**

Реакции рестрикции и лигирования ДНК проводились по стандартным протоколам, рекомендованным производителем используемых ферментов.

#### **2.4.1.6 Реакции модульного клонирования ДНК**

Реакции модульного клонирования ДНК проводились по протоколам, рекомендованным [Weber и др., 2011; Engler и др., 2014; Lee и др., 2015] для последующей трансформации соответствующих организмов.

#### **2.4.1.7 Амплификация ДНК**

При клонированиях для амплификации ДНК и для тестирования полученных конструкций (скрининга) применяли стандартную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием Encyclo PCR Kit и Screen Mix Kit (Евроген, Россия). Амплификацию проводили с помощью приборов, указанных в разделе “Оборудование”. Синтез олигонуклеотидов, использованных для амплификации ДНК, заказывали в компании Евроген.

#### **2.4.1.8 Электрофорез ДНК в агарозном геле**

Электрофорез ДНК проводили в 1-1,5% агарозном геле в ТАЕ-буфере (40 мМ Трис ацетат, 2 мМ ЭДТА) при 10 В/см в течение 10-15 мин. Для анализа ПЦР-продуктов и векторов в агарозный гель добавляли бромистый этидий до концентрации 0,5 мкг/мл.

#### **2.4.1.9 Оптимизация последовательностей ДНК**

Оптимизацию последовательностей ДНК проводили с помощью онлайн-ресурса Codon Optimization Tool, расположенного по адресу <https://eu.idtdna.com/CodonOpt>

#### **2.4.1.10 Химический синтез последовательностей ДНК**

Химический синтез последовательностей ДНК заказывали в фирмах Integrated DNA Technologies (США) или Twist Bioscience (США).

#### **2.4.1.11 Выделение геномной ДНК**

Выделение геномной ДНК проводили с использованием набора ExtractDNA Blood (Евроген) с предварительным разрушением биомассы с помощью перетирания в жидком азоте.

#### **2.4.1.12 Подтверждение встройки в геномную ДНК**

Для подтверждения встройки генов в геномную ДНК растений проводили амплификацию фрагментов исследуемых генов. Праймеры, использованные для амплификации, приведены в **Приложении 1**.

#### **2.4.1.13 Выделение суммарной РНК**

Для выделения суммарной РНК мы гомогенизировали образцы листьев в жидком азоте и ресуспендировали в 1 мл реагента Тризол (Qiagen). Раствор инкубировали в течение 5 мин при 56°C, затем дважды экстрагировали 200 мкл хлороформа, центрифугируя раствор при 12000 об/мин в центрифуге с охлаждением 5415R Eppendorf при температуре 4°C в течение 15 мин. К водной фазе добавляли 500 мкл изопропанола, затем центрифугировали в центрифуге MiniSpin Eppendorf при 13000 об/мин в течение 10 мин. Осадок промывали 80 % этанолом и после испарения спирта растворяли в 30 мкл деионизированной воды. Для анализа интактности выделенного препарата тотальной РНК аликвоту препарата 1 мкл исследовали методом гель-электрофореза в агарозном геле.

#### **2.4.1.14 ОТ-ПЦР**

Для получения первой цепи кДНК использовали набор реактивов MMLV (Евроген, Россия). 1-3 мкл раствора суммарной РНК, содержащих около 1 мкг РНК, смешивали с 1 мкл CDS1 олиго-Т праймера, объём доводили mQ H<sub>2</sub>O до 10 мкл. Раствор нагревали до 70°C в течение 2 мин для плавления возможных вторичных структур РНК и отжига олиго-Т праймера, затем охлаждали до 4°C в течение 5 мин.

Затем к раствору добавляли 10 мкл смеси для синтеза первой цепи кДНК, содержащей буфер для синтеза первой цепи (First strand mix, Евроген, Россия), 1 мкл 50×раствора нуклеотидтрифосфатов, 1 мкл раствора ревертазы MMLV (Евроген, Россия), 4 мМ дитиотрейтола и деионизированной воды. Синтез проводили при 42°C в течение 1 ч.

#### **2.4.1.13 ПЦР в реальном времени**

Для анализа уровня транскрипции мы проводили амплификацию фрагмента первой цепи кДНК в реальном времени с олигонуклеотидами, специфичными к гену *luz* при использовании смеси для амплификации qPCR Mix SYBR Low ROX (Евроген, Россия) на амплификаторе 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, США). Анализ результатов амплификации проводили с помощью собственного ПО 7500 Real-Time System. Амплификацию фрагмента, представляющего ДНК-копию транскрипта гена *nlnuz*, проводили с помощью праймеров с последовательностями GGACCAGGAGTCCCAGGC и CTTGGCATTTTCGACAATCTTA.

### **2.4.2 Методы работы с бактериями**

#### **2.4.2.1 Протокол приготовления компетентных бактериальных клеток**

Бактериальные клетки высевали из стока на 4-5 чашек с твердой средой LB и селективным антибиотиком и инкубировали 24 часа при температуре 27°C для *A. tumefaciens* или 37°C для *E. coli*. Затем всю биомассу бактерий переносили в 800 мл жидкой среды SOB и наращивали при качании до оптической плотности 1 единица (регистрировали при 600 нм), после чего последовательно промывали деионизированной водой (3 раза) и раствором 10% глицерина в деионизированной воде (3 раза). Оставшуюся биомассу бактерий ресуспендировали в 6 мл воды, разделяли на аликвоты по 45-100 мкл и использовали для трансформации либо замораживали и хранили при -80°C.

#### **2.4.2.2 Трансформация клеток *Escherichia coli* методом электропорации**

Для проведения процедуры электропорации фасовку компетентных клеток размораживали на льду и смешивали с 50-100 нг трансформирующей ДНК, очищенной от солей. Суспензию клеток переносили в кюветы для электропорации с зазором 0,1 см (Eppendorf, США) и подвергали электропорации на приборе MicroPulser (Bio-Rad,

США) по стандартному протоколу для *E. coli*. После электропорации в кювету добавляли 1 мл среды LB, клетки переносили в чистую пробирку и инкубировали при качании 30-60 мин при 37°C, а затем высевали на чашки с селективной средой.

#### **2.4.2.3 Трансформация клеток *Agrobacterium tumefaciens* методом электропорации**

Для проведения процедуры электропорации фасовку компетентных клеток размораживали на льду и смешивали с 0,5-1 мкг трансформирующей ДНК, очищенной от солей. Суспензию клеток переносили в кюветы для электропорации с зазором 0,2 см (Eppendorf, США) и подвергали электропорации на приборе MicroPulser (Bio-Rad, США) по стандартному протоколу для *A. tumefaciens*. После электропорации в кювету добавляли 1 мл среды LB, клетки переносили в чистую пробирку и инкубировали без качания 60-120 мин при 27°C, а затем высевали на чашки с селективной средой. Ссылки на онлайн-последовательности всех плазмид, использованных для трансформации, приведены в **Приложении 4**.

### **2.4.3 Методы работы с дрожжами *Pichia pastoris***

#### **2.4.3.1 Протокол приготовления компетентных клеток дрожжей**

Клетки из музея высевали на чашку с твердой средой YPD и селективными антибиотиками. После 48-72 ч инкубирования при 30°C биомассой одного клона инокулировали 5-10 мл жидкой среды YPD без антибиотиков и инкубировали при качании при 30°C в течение 6-8 часов. Далее часть суспензии переносили в колбу на 1-2 л и разбавляли в жидкой среде YPD без антибиотиков в 100-1000 раз. Колбы инкубировали при качании 12-14 часов до оптической плотности суспензии 1 единица. Клетки концентрировали с помощью центрифугирования, переносили в среду YPD с добавлением 1/6 части NEPES (1M) и 1/48 части DTT (1M) и инкубировали 30 минут при качании при 30°C. Затем клетки 3 раза последовательно промывали сорбитолом (1 M), оставшуюся биомассу ресуспендировали в 1-5 мл сорбитола и использовали для трансформации либо замораживали и хранили при -80°C.

#### **2.4.3.2 Трансформация клеток *Pichia pastoris* методом электропорации**

Для проведения процедуры электропорации фасовку компетентных клеток размораживали на льду и смешивали с 0,5-1 мкг линейаризованной трансформирующей ДНК, очищенной от солей. Суспензию клеток переносили в кюветы для электропорации с зазором 0,2 см (Eppendorf, США) и подвергали электропорации на приборе MicroPulser (Bio-Rad, США) по стандартному протоколу для *P. pastoris*. После электропорации в кювету добавляли 1 мл сорбитола (1М), клетки переносили в чистую пробирку и инкубировали без качания 60 мин при 30°C, затем добавляли 1 мл YPD без антибиотиков и инкубировали при качании 60 минут при 30°C. После этого суспензию высевали на чашки с селективной средой. Все плазмиды, использованные для трансформации клеток *P. pastoris*, приведены в **Приложении 2**.

#### **2.4.3.3 Отбор дрожжей *Pichia pastoris* на твёрдой среде YPDS с**

##### **селективными антибиотиками**

Для отбора положительных клонов *Pichia pastoris*, несущих геномную вставку исследуемого нами гена, мы использовали селективные антибиотики в следующих концентрациях: зеоцин (Invivogen) - 100 мкг/мл, G418 (Formedium) - 250 мкг/мл, бластицидин S (Invivogen) - 200 мкг/мл, гигромицин В (Formedium) - 300 мкг/мл.

#### **2.4.3.4 Отбор дрожжей *Pichia pastoris* на твёрдой среде RDB без добавления**

##### **гистидина**

Для отбора положительных клонов *Pichia pastoris*, несущих геномную вставку исследуемого нами гена, мы использовали метод восстановления ауксотрофности по гистидину и использовали твёрдую среду RDB с добавлением всех незаменимых для *Pichia pastoris* аминокислот, кроме гистидина.

#### **2.4.3.5 Капельный тест (drop-test)**

Для проверки ответа дрожжей на добавление субстрата мы проводили капельный тест. Часть биомассы отдельного клона дрожжей переносили в 5-7 мл среды YPD и наращивали в течение 8 часов при качании при 30°C. Далее 10 мкл дрожжевой суспензии переносили на чашку с твёрдой средой YPD и всеми необходимыми селективными антибиотиками и оставляли до высыхания при комнатной температуре.

После этого чашку инкубировали при 30°C на 24 часа. К выросшим за это время колониям дрожжей круглой формы добавляли субстрат и проводили имиджинг с помощью аппаратуры Fusion Pulse.7.

#### **2.4.4 Методы работы с культурами клеток млекопитающих HEK293NT**

##### **2.4.4.1 Пассирование культуры клеток млекопитающих HEK293NT**

Культуру клеток млекопитающих HEK293NT выращивали на культуральных матрасах площадью 25, 75 или 175 кв.см. в среде DMEM с 10% фетальной телячьей сыворотки и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (1 мл на каждые 5 см<sup>2</sup> площади культурального матраса) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. По достижении клетками плотности монослоя производили пересев. Для этого отбирали старую среду, однократно промывали монослой клеток смесью трипсин/Версен, и добавляли её на клетки из расчета 1 мл/25 см<sup>2</sup>. Культуральный матрас инкубировали при 37°C 1-5 мин до полного открепления клеток от поверхности культивируемой посуды. Далее суспендировали содержимое пипетированием до гомогенного состояния, часть отбирали в культуральный матрас или чашку со свежей средой DMEM, осторожно перемешивали и переносили в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

##### **2.4.4.2 Трансфекция культуры клеток млекопитающих HEK293NT**

Клетки млекопитающих линии HEK293T трансфицировали с помощью трансфекционного реагента Унифектин-56 (ИБХ РАН, Москва) по инструкции производителя. Для трансфекции клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко), дополненной сывороткой и глутамином, в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C до плотности приблизительно 50-70% от монослоя. Перед трансфекцией из чашек с клетками отбирали среду, оставляя около 600 мкл среды в чашке. Для трансфекции клеток трансфекционный реагент и 1 мкг плазмиды растворяли в 50 мкл среды OptiMEM (ПанЭко) из расчета 3 мкл реагента на 1 мкг ДНК. Плазмиду и трансфекционный реагент инкубировали при комнатной температуре 20 мин, затем добавляли в чашку с клетками. Питательную среду заменяли через 4 ч после трансфекции на среду DMEM (ПанЭко), дополненную сывороткой и глутамином и в ряде случаев содержащую дополнительно тирозин до насыщения. Ссылки на онлайн-последовательности всех плазмид, использованных для трансфекции, приведены в **Приложении 3**.

### **2.4.4.3 Концентрирование клеток перед измерением люминесценции**

Через 24 часа после трансфекции клетки промывали раствором DPBS (Gibco) и ресуспендировали в 1 мл DPBS на 25 см<sup>2</sup> площади чашки или культурального флакона. Затем клетки осаждали низкоскоростным центрифугированием (500-1000 оборотов в минуту, 5 минут, комнатная температура) и ресуспендировали в среде для имиджинга MEM, содержащей 20 мМ HEPES. В ряде случаев среда также содержала тирозин до насыщения. Далее клетки распределяли по 500 тысяч в лунку чёрного 96-луночного планшета.

## **2.4.5 Методы работы с растениями**

### **2.4.5.1 Агробактериальная трансформация**

Для переноса генетических конструкций в геном растений была использована агробактериальная трансформация. Агробактерии штамма AGL0, трансформированные целевой плазмидой, выращивали в течение 16 часов при качании при 28°C в среде с добавлением 25 мкг/мл рифампицина и 50 мкг/мл канамицина. Затем бактериальные суспензии были разбавлены до оптической плотности 0,6 единиц (при 600 нм) средой MS-medium. Листовые экспланты для трансформации отбирали у растений возрастом 2 недели и инкубировали с бактериальной суспензией в течение 20 минут. Затем листовые экспланты перекладывали на фильтровальную бумагу на твёрдую среду MS-medium с добавлением 1 мкг/мл 6-бензиламинопурина и 0,1 мкг/мл индолилуксусной кислоты. Через два дня после заражения экспланты переносили на такую же среду, к которой дополнительно были добавлены 500 мкг/мл цефотаксама и 75 мкг/мл канамицина. Регенерационные побеги отрезали и культивировали на твёрдой MS-medium с добавлением антибиотиков.

### **2.4.5.2 Культивация растений**

Культивация растений проводилась на станции искусственного климата БИОТРОН (ФИБХ РАН) под руководством Татьяны Митюшкиной.

### **2.4.5.3 Отбор листьев с растений**

Листья отбирали в течение суток с интервалом 3 часа с 27 растений *N. tabacum*, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты, возрастом 25 дней. Одновременно



отбирали листья с трёх растений, с каждого из них брали третий лист, считая от апикальной почки. Каждое растение обрабатывали один раз, для этого его выносили из теплицы и после обработки не приносили обратно в теплицу до окончания эксперимента, чтобы избежать воздействия летучих стресс-гормонов на остальные тестируемые растения.

## **2.4.6 Методы регистрации люминесценции**

### **2.4.6.1 Имиджинг с помощью IVIS Spectrum CT**

Регистрацию люминесценции с помощью IVIS Spectrum CT проводили при открытом светофильтре на поле зрения C. В зависимости от яркости образца использовали выдержку от 30 секунд до 5 минут и параметр binning (объединение пикселей) от 1 до 16. В случае регистрации люминесценции растительных тканей их предварительно выдерживали в тёмном контейнере в течение 30-40 минут, чтобы снизить автофлуоресценцию клеток, а фото при освещении делали после регистрации люминесценции. Анализ люминесценции проводили с помощью собственного ПО IVIS Spectrum CT.

### **2.4.6.2 Имиджинг с помощью Fusion pulse.7**

Регистрацию люминесценции с помощью Fusion pulse 7 проводили в режимах “Manual” или “Serial” с выдержкой 2-30 с в зависимости от яркости образца. Анализ люминесценции проводили с помощью программы ImageJ.

### **2.4.6.3 Имиджинг с помощью фотоаппаратов**

Фотографии светящихся растений делали с помощью фотоаппарата Sony Alpha ILCE-7M3 с объективами SEL50M28 (Sony, f/2.8), 35mm T1.5 ED AS UMC VDSLR (Samyang, ~f/1.4) или Meiji MA833 U и камеры смартфона Huawei P30 Pro в затемнённой комнате со штатива. Анализ люминесценции проводили с помощью программы ImageJ Fiji.

## Глава III. Результаты и обсуждение.

### 3.1 Предпосылки работы

В нашей научной группе за последние пять лет произошёл ряд открытий, касающихся биолюминесцентной системы грибов: во-первых, были открыты люциферин грибов, его непосредственный предшественник гиспидин [Purto и др., 2015] и продукт окисления оксилуциферин ((2Z,5E)-6-(3,4-дигидроксифенил)-2-гидрокси-4-оксогекса-2,5-диеновая кислота), а также разработаны пути химического синтеза этих трёх соединений [Kaskova и др., 2017], во-вторых, описана люцифераза грибов и кодирующий её ген [Котлобай, 2019], а в-третьих, были получены последовательности геномов биолюминесцентных грибов *Neonothopanus nambi*, *Neonothopanus gardneri*, *Mycena citricolor* и *Panellus stipticus*. Сочетание данных наработок позволило нам перейти к экспериментам по определению генов, отвечающих за биосинтез люциферина грибов, и их дальнейшему применению в гетерологических организмах.

### 3.2 Определение генов, входящих в кластер цикла кофейной кислоты.

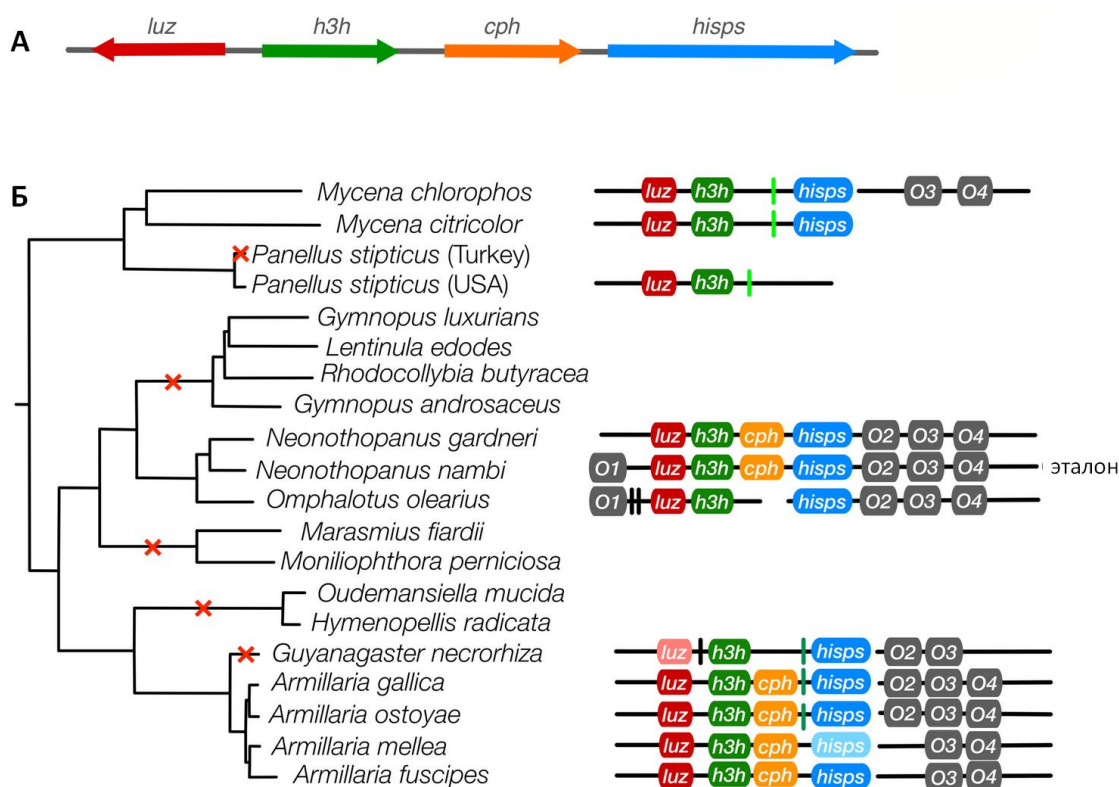
Известно, что гены грибов, кодирующих ферменты, которые относятся к одному и тому же метаболическому пути, часто располагаются в одном кластере [Keller и др., 2005, Lazarus и др., 2014]. Мы предположили, что гены ферментов биолюминесцентного каскада грибов также представляют собой единый кластер, поскольку предполагается, что биолюминесцентные реакции во всех грибах протекают по единому механизму [Oliveira и др., 2012]. Чтобы проверить это предположение, мы проанализировали области геномов *N. nambi*, *N. gardneri*, *M. citricolor*, и *P. stipticus*, соседствующие с геном люциферазы, определённым для каждого из этих грибов [Котлобай, 2019], а также сравнили полученные последовательности с доступными последовательностями геномов других биолюминесцентных и небиолюминесцентных грибов [Grigoriev и др., 2014; NCBI Resource Coordinators, 2017]. Этот анализ позволил нам выявить кластер генов, соседствующих с геном люциферазы. Данная работа была проведена совместно с Кареном Саркисяном (Группа синтетической биологии, ИБХ РАН), Юлианой Мокрушиной (Лаборатория биокатализа, ИБХ РАН) и Максимом Абакумовым (РНИМУ им. Пирогова). Химически синтезированные гиспидин и

оксилюциферин предоставлены Александрой Царьковой и Зинаидой Каськовой (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН).

### **3.2.1 Определение конститутивных участников кластера генов цикла кофейной кислоты**

В результате биоинформатического анализа мы установили, что ген люциферазы входит в состав консервативного кластера генов, в который помимо него входят, как минимум, ещё два гена, названные нами *h3h* и *hisps*. Данный кластер генов мы назвали кластером генов цикла кофейной кислоты, основываясь на предполагаемой функции продуктов данных генов. Подтверждение функции продуктов генов *h3h* и *hisps* будет описано в следующих разделах (разделы 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4). Схема кластера генов цикла кофейной кислоты для проанализированных грибов приведена на Рис. 9. Данная работа была проведена совместно с Кареном Саркисяном (Группа синтетической биологии, ИБХ РАН).

Нахождение столь консервативного кластера генов у всех светящихся грибов, геномы которых были исследованы, согласовывалось с гипотезой, что данные гены кодируют ферменты, которые относятся к одному метаболическому пути, поэтому мы перешли к изучению функций продуктов данных генов.

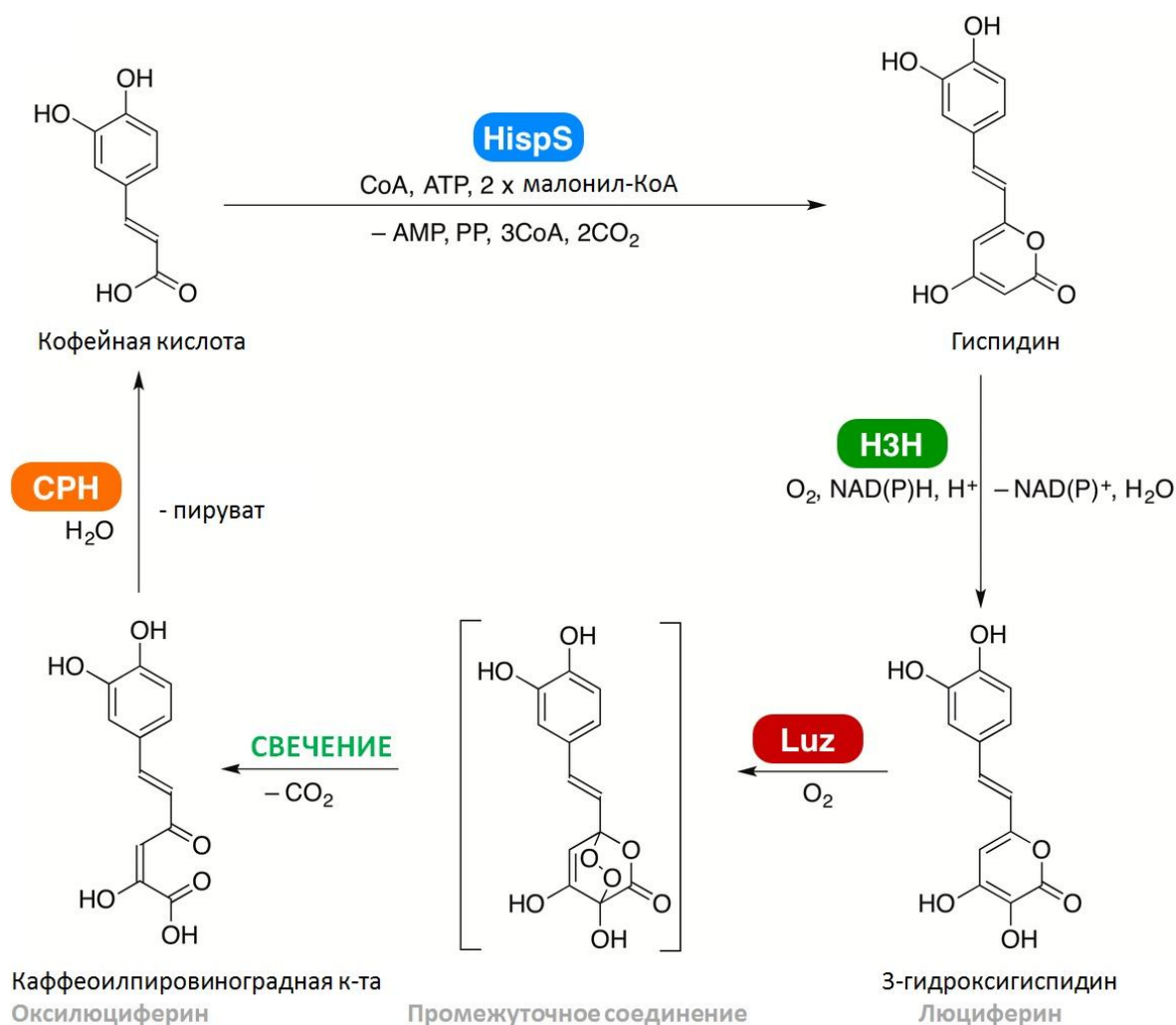


**Рисунок 9.** Кластер генов цикла кофейной кислоты. А – схема расположения генов люциферазы, гиспидин-3-гидроксилазы, каффеoilпируватгидролазы и гиспидинсинтазы в геноме гриба *N. nambi*. Б – кластер генов цикла кофейной кислоты биолуминесцентных грибов. Эталон – эталонная последовательность кластера *N. nambi*. Красным крестом отмечены те грибы (или те родственные группы грибов), которые потеряли способность к свечению. Справа отмечены относящиеся к кластеру гены, которые были обнаружены при анализе геномов данных грибов. Гены, кодирующие люциферазу (*luz*), гиспидин-3-гидроксилазу (*h3h*), гиспидинсинтазу (*hisps*) и каффеoilпируватгидролазу (*cph*) отмечены цветом, более светлый оттенок которого отражает, что была обнаружена только частичная относящаяся к данному гену последовательность. Другие гены, предположительно относящиеся к кластеру, названы O1-4 (помечены серым), зелёными чёрточками отмечены *p450*-подобный ген, чёрными – остальные гены.

### 3.2.2 Подтверждение функции продукта гена *h3h*

При поиске гомологов продукта гена *h3h* с помощью алгоритма выравнивания BLASTp были обнаружены 3-гидроксибензоат-6-монооксигеназы – ферменты, катализирующие окисление 3-гидроксибензоата молекулярным кислородом с расходом NADH. С химической точки зрения реакция очень похожа на этап

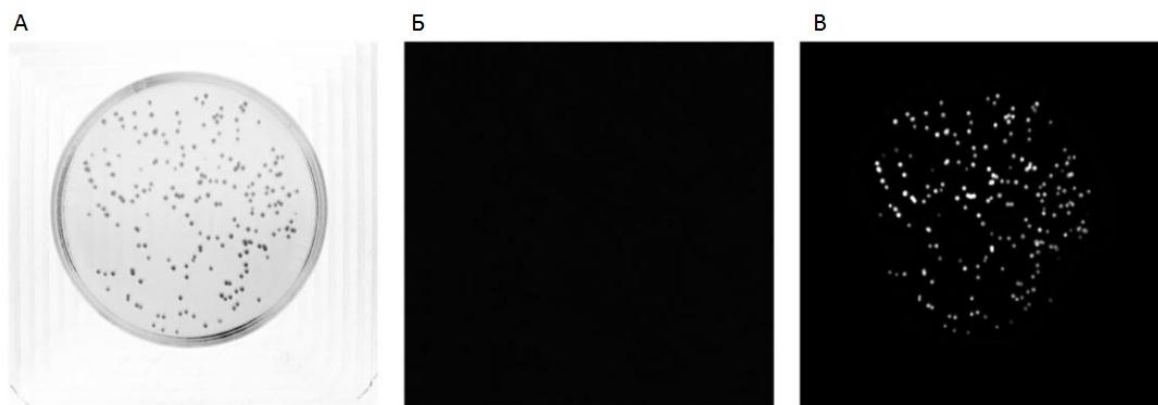
превращения гиспидина в 3-гидроксигиспидин – люциферин грибов. Общая схема реакций цикла кофейной кислоты, в том числе и непосредственно стадии биосинтеза люциферина грибов приведена на Рис. 10.



**Рисунок 10.** Цикл кофейной кислоты — предполагаемый путь биосинтеза и утилизации люциферина грибов. Кофейная кислота превращается в гиспидин с помощью гиспидинсинтазы (HispS), затем гиспидин гидроксилируется гиспидин-3-гидроксилазой (H3H) с образованием люциферина грибов. Люцифераза грибов (Luz) с помощью молекулярного кислорода формирует высокоэффективное промежуточное соединение — эндопероксид, который испускает свет, распадаясь до оксилуциферина (каффеoilпирувата). Оксилуциферин затем разлагается до кофейной кислоты с помощью каффеoilпируватгидролазы (CPH).

Гомология аминокислотной последовательности, описанная выше, позволила нам предположить, что продукт гена *h3h* (гиспидин-3-гидроксилаза, hispidin-3-hydroxylase, H3H) катализирует окисление гиспидина до 3-гидроксигиспидина. Для

проверки этой гипотезы мы амплифицировали последовательность данного гена и клонировали в экспрессионный вектор для дрожжей *Pichia pastoris* GAP-pPic9 (обеспечивает восстановление ауксотрофности дрожжей по гистидину), ссылка на онлайн-последовательность приведена в **Приложении 2**. Полученным вектором мы трансформировали дрожжи, уже несущие ген люциферазы *N.nambi*, и обнаружили, что при добавлении гиспидина к трансформированным дрожжам, те испускают свечение (Рис. 11), в отличие от дрожжей, несущих только ген люциферазы грибов. Этот факт подтвердил гипотезу о том, что НЗН *N. nambi* (nnНЗН) катализирует превращение гиспидина в люциферин. Данные эксперименты проведены совместно с Юлианой Мокрушиной (Лаборатория биокатализа, ИБХ РАН) и Максимом Абакумовым (РНИМУ им. Пирогова).



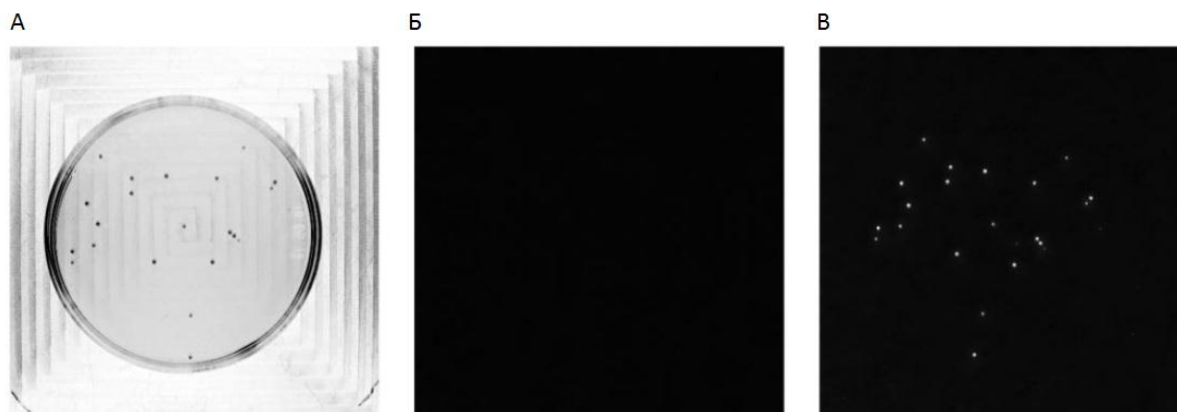
**Рисунок 11.** Дрожжи *P. pastoris*, несущие геномные копии генов *nmluz* и *nnh3h*. А – изображение при естественном освещении, Б – изображение в канале регистрации люминесценции без добавления субстрата, В – изображение в канале регистрации люминесценции после добавления гиспидина с концентрацией 0,215 ОЕ/мл в буфере DPBS с 1% ДМСО на Fusion-Pulse.7 (Vilber Lourmat) при экспозиции 2 с.

### 3.2.3 Подтверждение функции продукта гена *hisps*

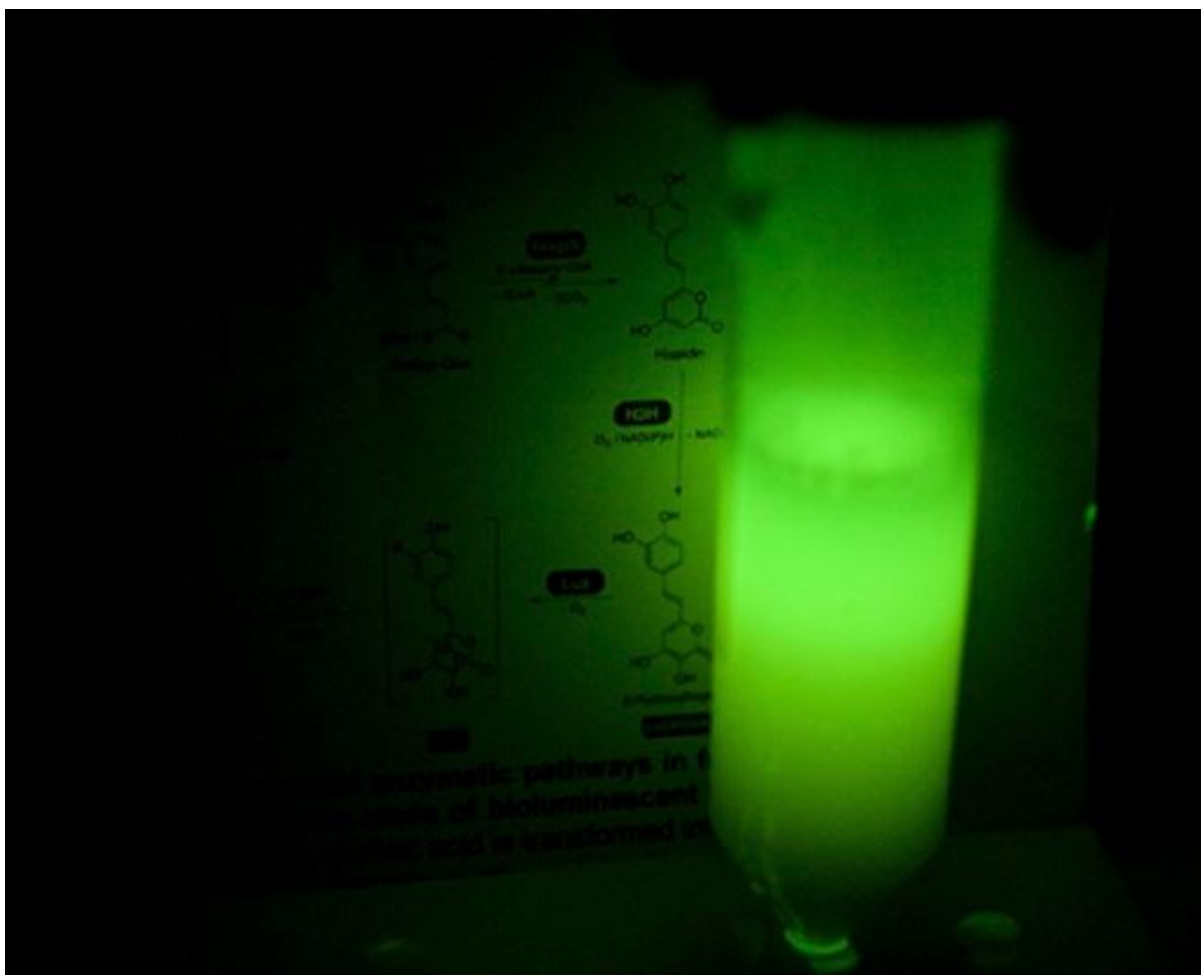
Биоинформатический анализ показал, что ген *hisps* кодирует белок из семейства поликетидсинтаз (ПКС) — ферментов, катализирующих биосинтез различных вторичных метаболитов в большом количестве живых организмов. ПКС катализируют реакции присоединения малонильного остатка к растущей углеродной цепи. Структура гиспидина и наличие в нём  $\alpha$ -пиронового кольца позволили нам предположить, что его биосинтез катализируется с помощью ПКС в результате двух циклов присоединения малонильных остатков с последующей лактонизацией (Рис. 10).

Большие модульные ПКС для активации требуют посттрансляционной модификации — фосфопантетеинилирования консервативного остатка серина в ацилпереносящем домене [Gao и др., 2013]. Для подтверждения функции продукта гена *hisps* мы ввели в геном *P. pastoris*, уже несущих гены *nnluz* и *nnh3h*, одновременно ген *nnhisps* в векторе pGar-Z (обеспечивает устойчивость к антибиотику зеоцину) и ген 4-фосфопантетеинилтрансферазы из *Aspergillus nidulans* (*npgA*) [Kim J.M. и др., 2015] в векторе pGar-Bsd (обеспечивает устойчивость к антибиотику бластицидину S), ссылки на онлайн-последовательности этих карт приведены в **Приложении 2**. При добавлении кофейной кислоты к дрожжам, несущим перечисленные 4 гена, как выращенным на твёрдой, так и на жидкой культуре, происходило испускание света (Рис. 12), причём в случае жидкой культуры такое свечение было видно невооружённым глазом и могло быть зарегистрировано фотоаппаратом с небольшой выдержкой (Рис. 13). Дрожжи, которые не несли хотя бы один из генов *nnhisps* или *npgA*, не демонстрировали свечение в ответ на добавление кофейной кислоты.

Таким образом, мы подтвердили функцию белка HispS, кодируемого геном *hisps*, а также необходимость его активации с помощью 4-фосфопантетеинилтрансферазы. Данные эксперименты проведены совместно с Юлианой Мокрушиной (Лаборатория биокатализа, ИБХ РАН).



**Рисунок 12.** Дрожжи *P. pastoris*, несущие геномные копии генов *nnluz*, *nnh3h*, *nnhisps* и *npgA*. А – изображение при естественном освещении, Б – изображение в канале регистрации люминесценции без добавления субстрата, В – изображение в канале регистрации люминесценции после добавления раствора кофейной кислоты с концентрацией 0,018 М/мл в буфере DPBS с 1% ДМСО на Fusion-Pulse.7 (Vilber Lourmat) при экспозиции 2 с.

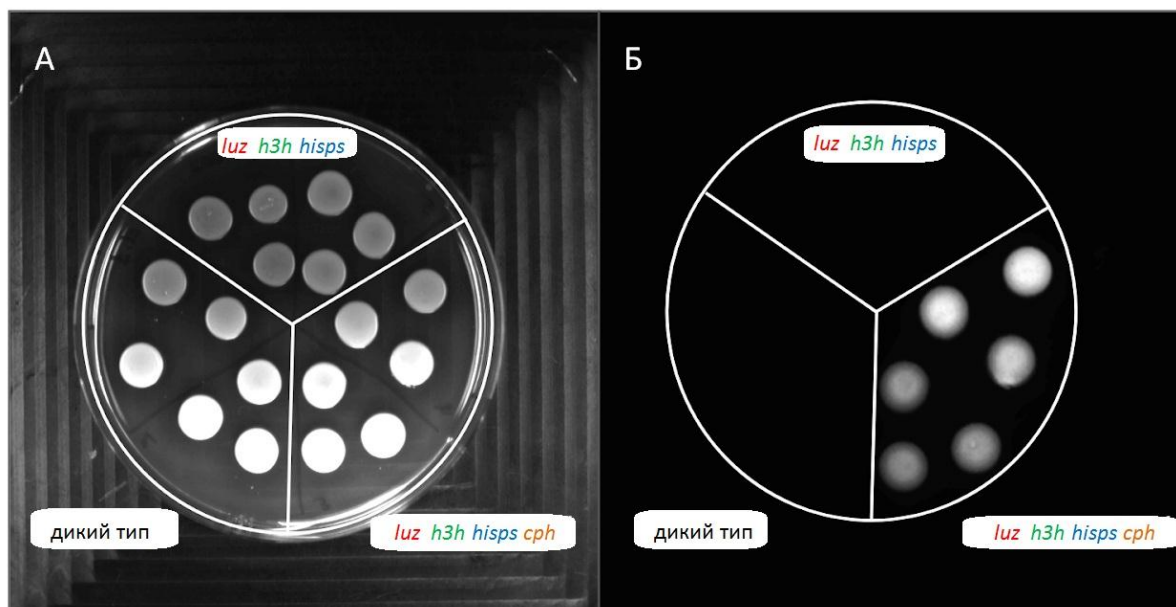


**Рисунок 13.** Фото суспензии клеток *P. pastoris*, несущих геномные копии генов *nmluz*, *nnh3h*, *nnhisps* и *npgA*, выращенные в среде с 0,75% кофейной кислоты. Фото получено с помощью фотоаппарата NIKON D800, ISO 1600, экспозиция 8 с.

### 3.2.4 Подтверждение функции продукта гена *cpH*

Для подтверждения функции продукта гена *cpH* мы ввели в геном *P. pastoris*, уже несущих гены *nnhisps*, *nmluz*, *nnh3h* и *npgA*, также ген *cpH* в векторе pGар-Kan (обеспечивает устойчивость к антибиотику G418). Полученные дрожжи в результате капельного теста (“drop-test”) демонстрировали свечение в ответ на добавление оксилициферина, тогда как дрожжи, в которых ген *cpH* отсутствовал, не демонстрировали такую реакцию (Рис. 14). Данные эксперименты проведены совместно с Ксенией Береговой (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН)



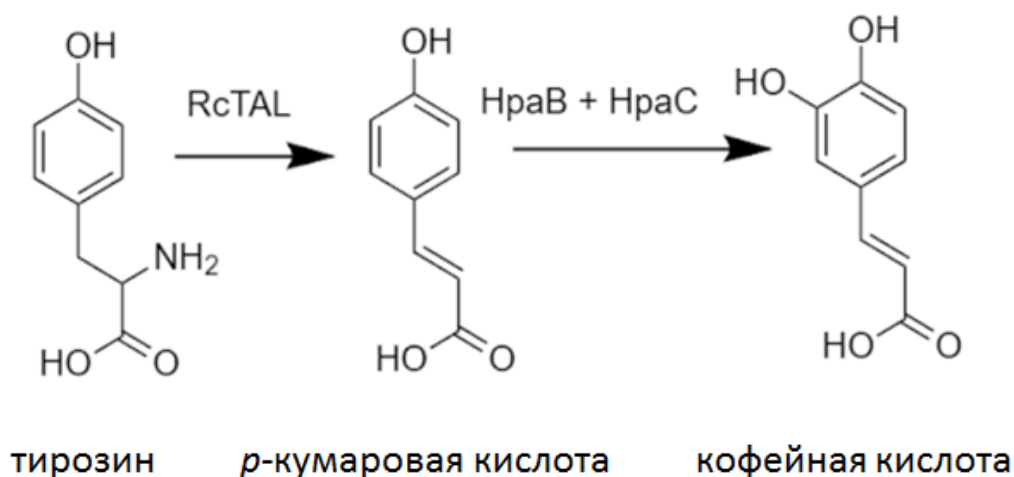


**Рисунок 14.** Капельный тест на дрожжах *P. pastoris* дикого типа (левая нижняя треть), несущих геномные копии генов *luz*, *h3h*, *hisps* и *npgA* (верхняя треть), несущих геномные копии генов *luz*, *h3h*, *hisps*, *npgA* и *cph* (правая нижняя треть) при добавлении оксифлуоресцина растворенного в цитратном буфере (pH 4,5) до конечной концентрации 110 мМ. А – изображение при естественном освещении, Б – изображение в режиме регистрации люминесценции на Fusion-Pulse.7 (Vilber Lourmat) при экспозиции 2 с.

Таким образом, мы обнаружили и подтвердили функцию трёх генов (*nnhisps*, *cph*, *nnh3h*), входящих наравне с геном люциферазы в кластер генов кофейной кислоты, изображённый на Рис 9.

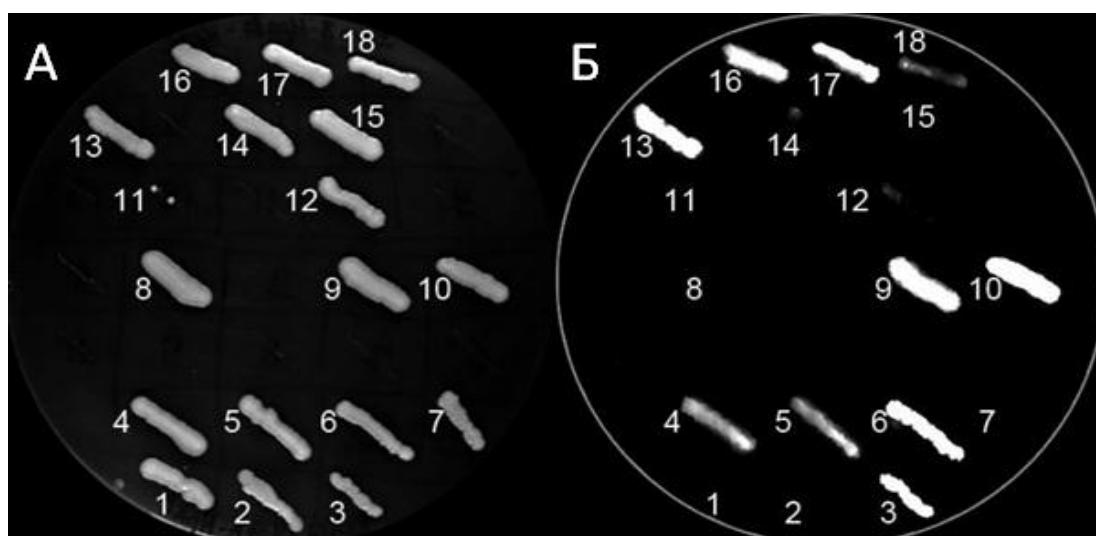
### 3.3 Создание автономно биолюминесцентных дрожжей *Pichia pastoris*

Для создания автономно биолюминесцентных дрожжей *P. pastoris* мы одновременно ввели в геном описанных выше дрожжей, несущих гены *nmluz*, *nnhisps*, *cph*, *nnh3h*, *npgA*, дополнительно гены тирозин-аммоний-лиазы *rctal* из *Rhodobacter capsulatus* и гены, кодирующие гетеродимерный фермент кумарат-3-гидроксилазу (СЗН) *hpab* и *hpac* из *E.coli* в векторах pGar-Hyg (обеспечивают устойчивость к антибиотику гигромицину В). Данные ферменты катализируют реакцию последовательного превращения аминокислоты тирозин в *p*-кумаровую, а затем в кофейную кислоту (Рис. 15).



**Рисунок 15.** Схема двухстадийного превращения тирозина в кофейную кислоту. Первый шаг (превращение в *p*-кумаровую кислоту) катализирует тирозин-аммоний-лиаза (RcTAL – тирозин-аммоний-лиаза из *Rhodobacter capsulatus*), второй шаг (превращение в кофейную кислоту) катализирует кумарат-3-гидроксилаза (белки HraB и HraC из *E. coli* формируют гетеродимер с этой функцией).

При культивации данных дрожжей на среде, содержащей добавленный тирозин, колонии испускали свет без дополнительного внесения каких-либо субстратов (Рис. 16). Данные эксперименты проведены совместно с Юлианой Мокрушиной (Лаборатория биокатализа, ИБХ РАН).



**Рисунок 16.** Автономная биолюминесценция клонов *Pichia pastoris*, несущих геномные копии генов биосинтеза люциферина (*luz*, *h3h*, *npaA*, *hisps*) и генов биосинтеза кофейной кислоты (*rctal*, *hpaB* и *hpaC*). А – изображение при естественном освещении, Б – изображение в канале регистрации свечения на Fusion-Pulse.7 (Vilber Lourmat) при экспозиции 30 с.

Несмотря на то, что использования только генов цикла кофейной кислоты было недостаточно для создания автономно биолюминесцентных дрожжей *P. pastoris*, и нам потребовалось ввести также 4 вспомогательных гена (*npgA* – ген 4-фосфопантетеинилтрансферазы из *A. nidulans*, *rctal* – ген тирозин-аммоний-лиазы из *R. capsulatus*, а также гены *hpab* и *hpac* из *E. coli*, кодирующие гетеродимерную кумарат-3-гидроксилазу), основу функциональности свечения составляли именно гены цикла кофейной кислоты. Кроме того, кофейная кислота не является высокопредставленным вторичным метаболитом дрожжей, однако может быть обнаружена в значительных количествах в других организмах – например, в растениях, что позволило нам рассчитывать на более простую схему создания автономно светящихся растений по сравнению с дрожжами *P. pastoris*.

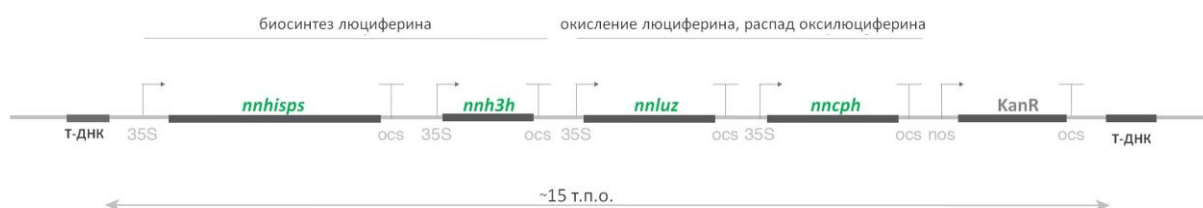
### **3.4 Создание автономно биолюминесцентных растений *Nicotiana tabacum* и *Nicotiana benthamiana***

#### **3.4.1 Анализ возможности создания автономно светящихся растений с помощью введения генов цикла кофейной кислоты**

Кофейная кислота — один из ключевых метаболитов сосудистых растений, поскольку производными именно этого соединения являются такие важные для функционирования растения вещества, как фенилпропаноиды, в частности, лигнин (один из основных компонентов, обеспечивающих прочность древесины). Наличие в растениях рода *Nicotiana* кофейной кислоты [Li и др., 2016] позволило нам предположить, что введение в геном растения генов цикла кофейной кислоты приведёт к автономному свечению растения (Рис. 17Б). Кроме того, сопоставление полученного в работе [Котлобай, 2019] спектра биолюминесценции люциферазы грибов и полученного нами спектра поглощения листьев растения *Nicotiana benthamiana* дало нам основания полагать, что люминесцентное свечение будет минимально поглощаться собственными тканями растения (Рис. 17А). Данная работа проведена совместно с Александрой Царьковой (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН) и Кареном Саркисяном (Группа синтетической биологии, ИБХ РАН).



клонирования конструкции, несущую оптимизированные гены цикла кофейной кислоты (исходные кодоны были заменены на более эффективные для экспрессии в растениях рода *Nicotiana* с помощью алгоритма IDT-Codon Optimization) под сильными конститутивными промоторами, а также ген устойчивости к антибиотику и последовательности для встройки в геном. Схема данной конструкции приведена на Рис. 18. Указанные эксперименты были проведены совместно с Кареном Саркисяном (Группа синтетической биологии, ИБХ РАН).



**Рисунок 18.** Схема встраиваемой в геном растений части плазмиды, использованной для агробактериальной трансформации. Обозначения: 35s, pos – конститутивные растительные промоторы, ocs – терминатор, Т-ДНК – последовательность для интеграции ДНК в геном растений с помощью агробактериальной трансформации, *nnhisps*, *nnh3h*, *nnluz*, *nncph* – гены цикла кофейной кислоты, KanR – ген устойчивости к антибиотику G418.

С помощью агробактериальной трансформации данная конструкция была перенесена в растения *N. tabacum* и *N. benthamiana* и встройка подтверждена выделением геномной ДНК из этих растений и амплификацией фрагментов встраиваемых генов. Данная работа была проведена совместно с Татьяной Митюшкиной и Лилией Фахрануровой (Лаборатория экспрессионных систем и модификации генома растений, ФИБХ РАН).

### 3.4.3 Имиджинг светящихся растений

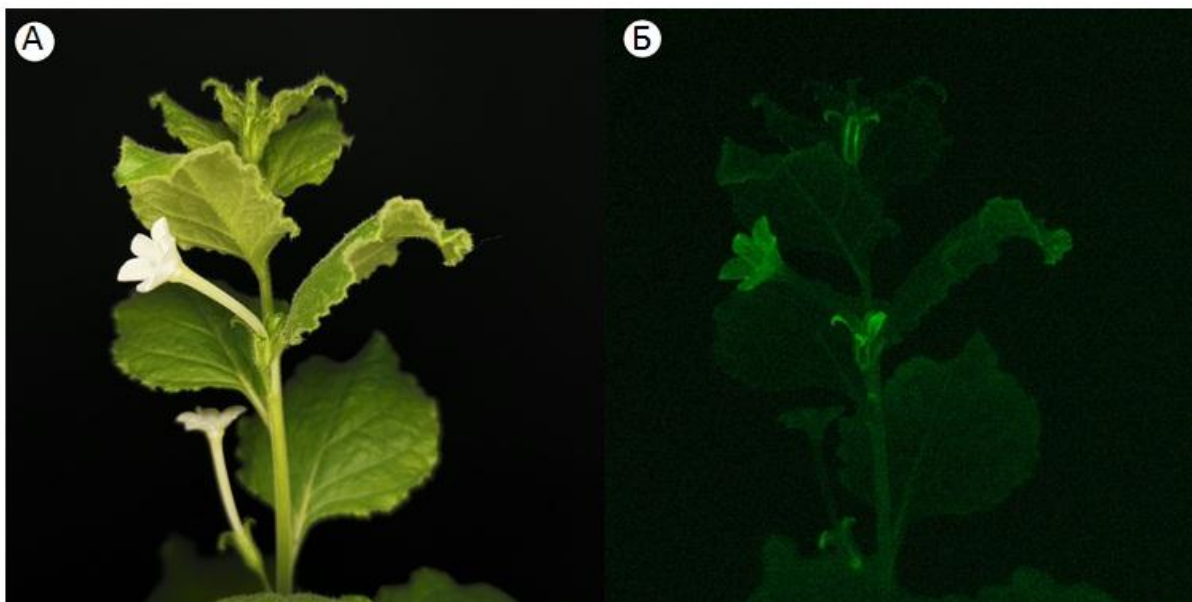
Полученные трансформированные растения выращивали до разных возрастных стадий и проверяли их свечение с помощью различных методов имиджинга. Свечение демонстрировали все возрастные группы растений, однако наиболее яркое свечение наблюдалось у молодых тканей. Также в период цветения происходило затухание свечения вегетативных тканей и, наоборот, ярче светились цветки. На Рис. 19 приведены примеры свечения разных возрастных групп растений *N. tabacum* со введёнными генами цикла кофейной кислоты. Данная работа была проведена

совместно с Александром Мишиным (Группа молекулярных меток для оптической наноскопии, ИБХ РАН).



**Рисунок 19.** Билюминесценция растений *N. tabacum* и их частей в различном возрасте. А – проростки, Б – молодые растения (возраст 3 недели), В – взрослые растения (возраст 2 месяца), Г – корни, Д – срез цветков. Фото сделаны с помощью Sony Alpha ILCE-7M3.

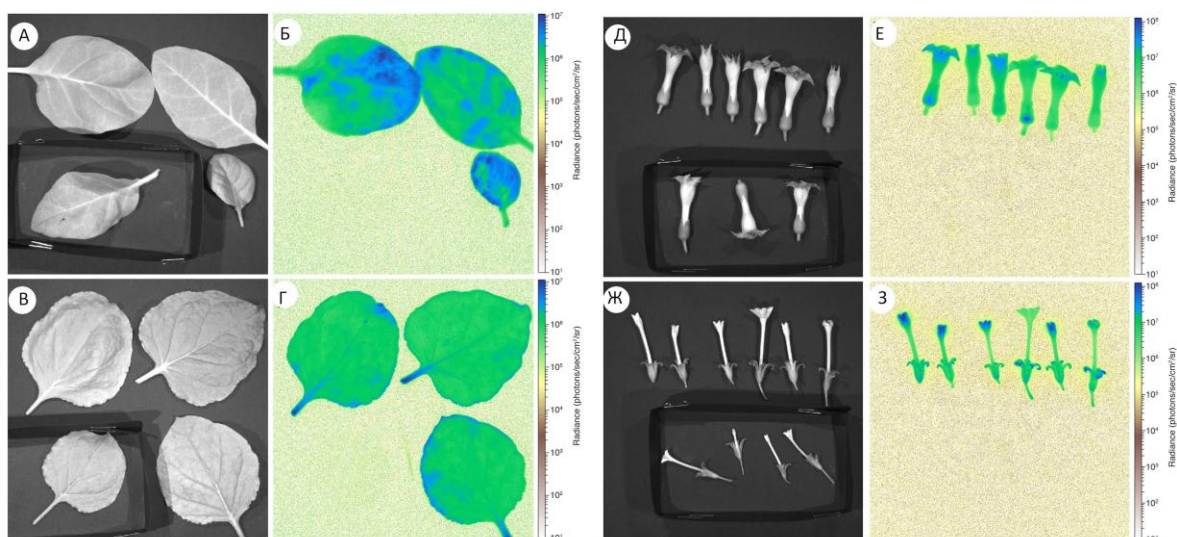
Билюминесценция растений была настолько яркой, что после 3-5-минутного пребывания в тёмном помещении возможно было различить её невооружённым глазом, а также зарегистрировать на камеру современного смартфона (Рис. 20).



**Рисунок 20.** Фото светящегося растения *N. benthamiana*, сделанные с помощью смартфона. А – фото при внешнем освещении, Б – фото в темноте с выдержкой 30 с.

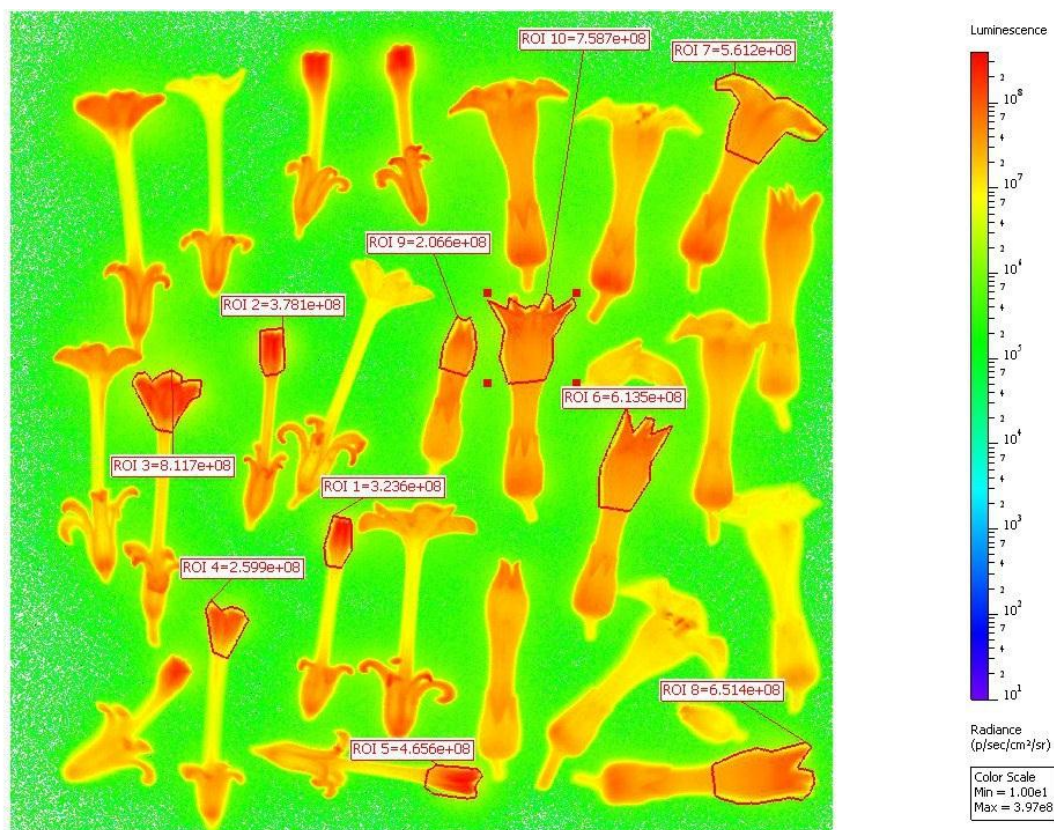
#### 3.4.4 Количественное измерение свечения частей растения

Невооружённым глазом при изучении светящихся растений было заметно, что различные части растений светятся с разной интенсивностью. Для определения наиболее ярких частей растения мы отобрали типичные листья и типичные цветки с цветущих растений *N. tabacum* и *N. benthamiana*, а также каллусы *N. tabacum* и *N. benthamiana*. Свечение данных частей мы зарегистрировали с помощью IVIS Spectrum СТ и вычислили среднюю интенсивность свечения в фотонах в секунду на квадратный сантиметр с помощью собственного ПО IVIS Spectrum СТ. Типичные фотографии светящихся частей приведены на Рис. 21-22, количественные результаты анализа свечения приведены в **Таблице 1**. Данные эксперименты проведены совместно с Александром Мишиным (Группа молекулярных меток для оптической наноскопии, ИБХ РАН) и Татьяной Чепурных (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН).



**Рисунок 21.** Фото частей растений *N. tabacum* и *N. benthamiana*. А – листья *N. tabacum*, внешний источник света; Б – листья *N. tabacum*, режим регистрации люминесценции, binning 1, выдержка 30 с; В – листья *N. benthamiana*, внешний источник света; Г – листья *N. benthamiana*, режим регистрации люминесценции, binning 1, выдержка 30 с; Д – цветки *N. tabacum*, внешний источник света; Е – цветки *N. tabacum*, режим регистрации люминесценции, binning 1, выдержка 30 с; Ж – цветки *N. benthamiana*, внешний источник света; З – цветки *N. benthamiana*, режим регистрации люминесценции, binning 1, выдержка 30 с. В каждом случае в чёрной бумажной коробочке располагаются соответствующие органы контрольных не светящихся растений. Псевдоцветами обозначена интенсивность свечения (логарифмическая шкала расположена справа на изображениях Б, Г, Е, З, минимум отображаемого свечения – 10 фотонов).





**Рисунок 22.** Цветки *N. benthamiana* (слева) и *N. tabacum* (справа), использованные для определения среднего свечения. На типичных цветках выделены области интереса (ROI). Значения, отображаемые для ROI — общий фотонный поток для этой области.

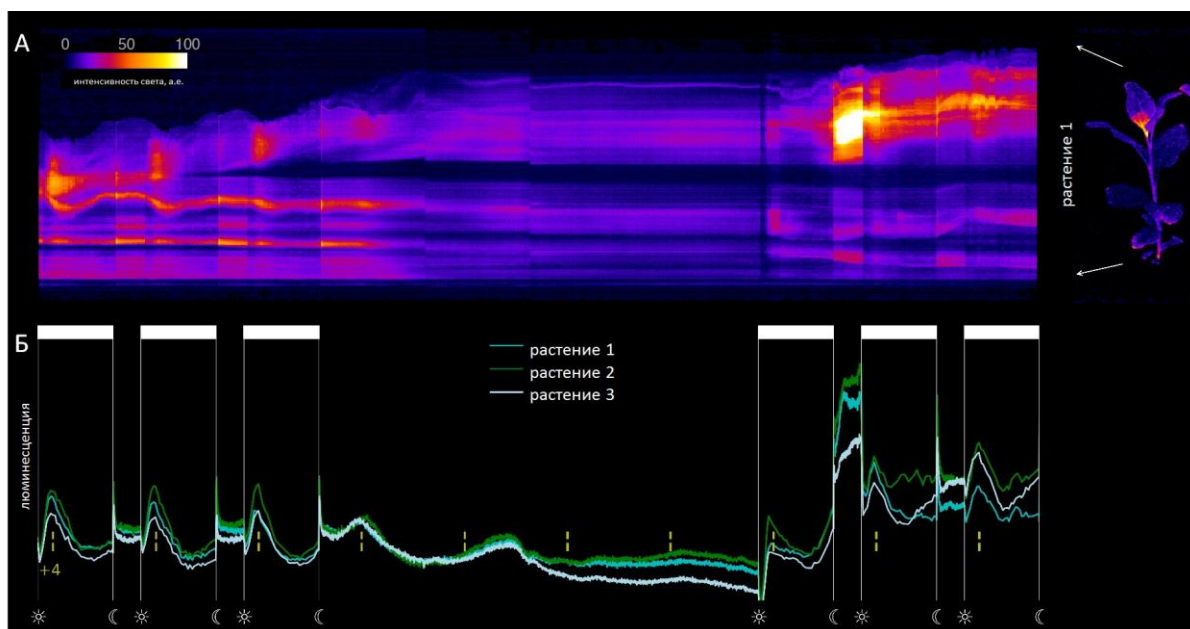
**Таблица 1.** Интенсивность люминесценции листьев, цветков и каллусов *N. benthamiana* и *N. tabacum*, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты.

Вид	Генотип	Тип ткани	Средняя интенсивность излучения фотон/мин/см <sup>2</sup>	Стандартное отклонение	Число образцов
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>nnhisps</i> , <i>nnh3h</i> , <i>nnluz</i> , <i>nncph</i> , KanR	лист	$5.58 \times 10^9$	$1.40 \times 10^9$	19
		цветок	$6.47 \times 10^{10}$	$1.60 \times 10^{10}$	5
		каллус	$3.90 \times 10^{10}$	$1.60 \times 10^{10}$	24
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>nnhisps</i> , <i>nnh3h</i> , <i>nnluz</i> , <i>nncph</i> , KanR	лист	$4.31 \times 10^9$	$8.44 \times 10^8$	33
		цветок	$3.17 \times 10^{10}$	$4.76 \times 10^9$	5
		каллус	$1.97 \times 10^{10}$	$6.21 \times 10^9$	6

Из **Таблицы 1** видно что различные биологические ткани растений светятся с различной интенсивностью и наиболее яркими как для *N. benthamiana*, так и для *N. tabacum* являются цветки. Также достаточно яркими являются каллусы, которые представляют из себя малодифференцированные и быстро делящиеся ткани растений. Возможным объяснением различий в яркости является то, что, во-первых, в быстрорастущих тканях растений (к которым относятся каллусы, бутоны и расцветающие цветки) в целом более интенсивный метаболизм, следовательно, и относительное содержание кофейной кислоты выше, а во-вторых, кофейная кислота является одним из предшественников антоцианов (см. Рис. 17Б), которые отвечают за окраску цветков, следовательно, можно ожидать её повышенный уровень в цветках. Яркость цветков дополнительно можно объяснить тем, что кофейная кислота может транспортироваться из других органов растения, а не синтезируется непосредственно в цветках, поэтому такой отток также, возможно, вызывает снижение яркости листьев и увеличение яркости цветков. Кроме того, распределение ярких областей по растению в целом (Рис. 19) совпадало с описанным в литературе распределением активности фенилаланин-аммоний-лиазы — одного из ферментов, отвечающего за биосинтез предшественника кофейной кислоты (коричную кислоту) [Kawamata и др., 1997].

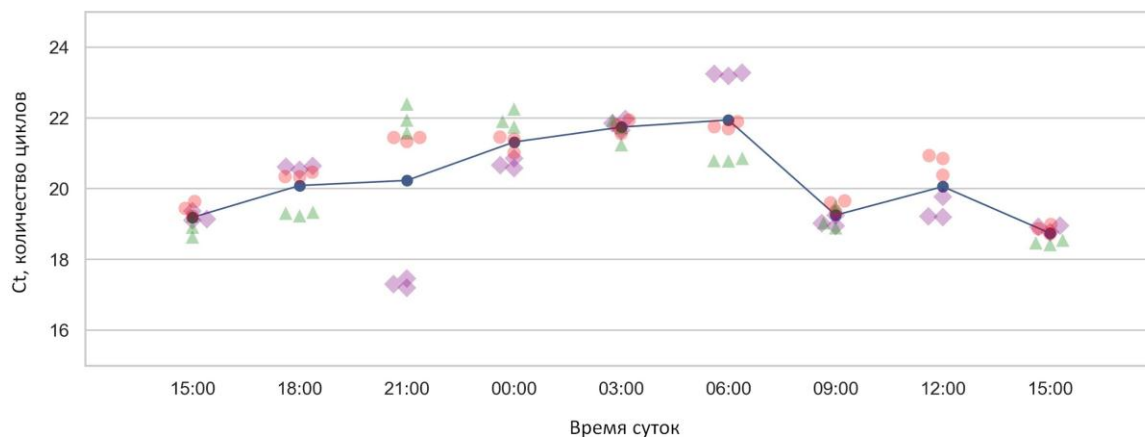
#### **3.4.5. Изменение свечения растений в течение суток**

При наблюдении растений в течение дня мы обнаружили, что их собственное свечение изменяется: когда мы регистрировали люминесценцию в течение светового дня, она была менее интенсивной, чем для тех же растений в течение ночи (Рис. 23). Данные для иллюстрации получены совместно с Александром Мишиным (Группа молекулярных меток для оптической наноскопии, ИБХ РАН).



**Рисунок 23.** Динамика люминесценции автономно светящегося растения *N. tabacum* в течение суток. А – циркадные колебания люминесценции: фото трёх растений регистрировались в течении 10 суток при нормальном световом дне (17,5 ч – освещённое время суток для дней 1-3 и 8-10) или в постоянной темноте (дни 4-7), каждая фотография растения 1 представлена в виде единой вертикальной линии пикселей для создания целой кимограммы; Б – средняя яркость каждого из трёх растений представлена в виде графика.

Несмотря на то, что гены цикла кофейной кислоты были введены под конститутивным вирусным промотором 35s, экспрессионная активность даже конститутивных промоторов может быть переменной в течение суток. Для поиска возможной корреляции между яркостью свечения растений и уровнем экспрессии гена люциферазы мы решили проанализировать экспрессию гена люциферазы в течение суток. Для этого мы отобрали листья по протоколу, описанному в разделе 2.4.5.3 главы “Материалы и методы”, выделили из них суммарную РНК, синтезировали первую цепь кДНК и с помощью ПЦР в реальном времени проанализировали уровень транскрипции гена люциферазы (Рис. 24).



**Рисунок 24.** Экспрессия гена *nnluz* в *N. tabacum* в течение суток. По оси ординат отмечено значение Ct (cycle threshold, пороговое значение циклов) для ПЦР в реальном времени при амплификации фрагмента ДНК-копии транскрипта *nnluz*. Все экспериментальные точки отмечены на графике, одним цветом обозначены технические реплики, разными цветами – различные биологические образцы. Синими точками отмечено среднее значение Ct для каждой временной точки.

Как было сказано выше, все гены цикла кофейной кислоты, введённые в геном *N. tabacum*, находились под контролем конститутивного вирусного промотора 35s, поэтому одной из гипотез было, что мы не сможем зарегистрировать значительное изменение в экспрессии какого-либо из этих генов. При проверке уровня экспрессии генов *nnh3h*, *nnhisps* и *nncph* это предположение подтвердилось: значения Ct для разных временных точек практически не отличались (данные не приведены). Однако в случае гена *nnluz* наблюдалась следующая закономерность: в течение ночных часов уровень транскрипции снижался (значения Ct являются обратно пропорциональными уровню транскрипции) и резко повышался после рассвета (в день сбора листьев рассвет был между 6:00 и 9:00). Свечение растений, наоборот, было интенсивнее в ночные часы (Рис. 23).

Таким образом, несмотря на явные суточные колебания экспрессии гена люциферазы, мы не обнаружили однозначной связи между уровнем экспрессии гена *nnluz* и увеличением свечения растений. Повышение экспрессии гена *nnluz* в дневные часы скорее является отражением общего увеличения метаболической активности растения в светлое время суток. Причины же увеличения яркости люминесценции растений в тёмное время ещё необходимо изучить.

### **3.5. Создание автономно биолюминесцентных клеток млекопитающих НЕК293NT**

Вдохновляющий успех по созданию автономно светящихся организмов из столь разных филогенетических групп, как дрожжи и цветковые растения дал нам возможность предполагать, что ферменты цикла кофейной кислоты также будут функциональны и в условиях другой модельной системы – культуры клеток млекопитающих. В качестве объекта исследований мы выбрали модифицированную культуру клеток почки эмбриона человека НЕК293NT. Данная культура легко и быстро размножается в лабораторных условиях, хорошо трансфицируется ДНК-конструкциями и демонстрирует относительно высокий уровень экспрессии гетерологических генов [Graham и др., 1977].

Дополнительным обоснованием выбора этого объекта послужило то, что данная культура клеток при экспрессии гена люциферазы грибов и экзогенном добавлении люциферина грибов демонстрировала биолюминесцентное свечение [Котлобай, 2019].

Все эксперименты в данном разделе выполнены соискателем лично.

#### **3.5.1 Создание ДНК-конструкций для экспрессии в культуре клеток млекопитающих**

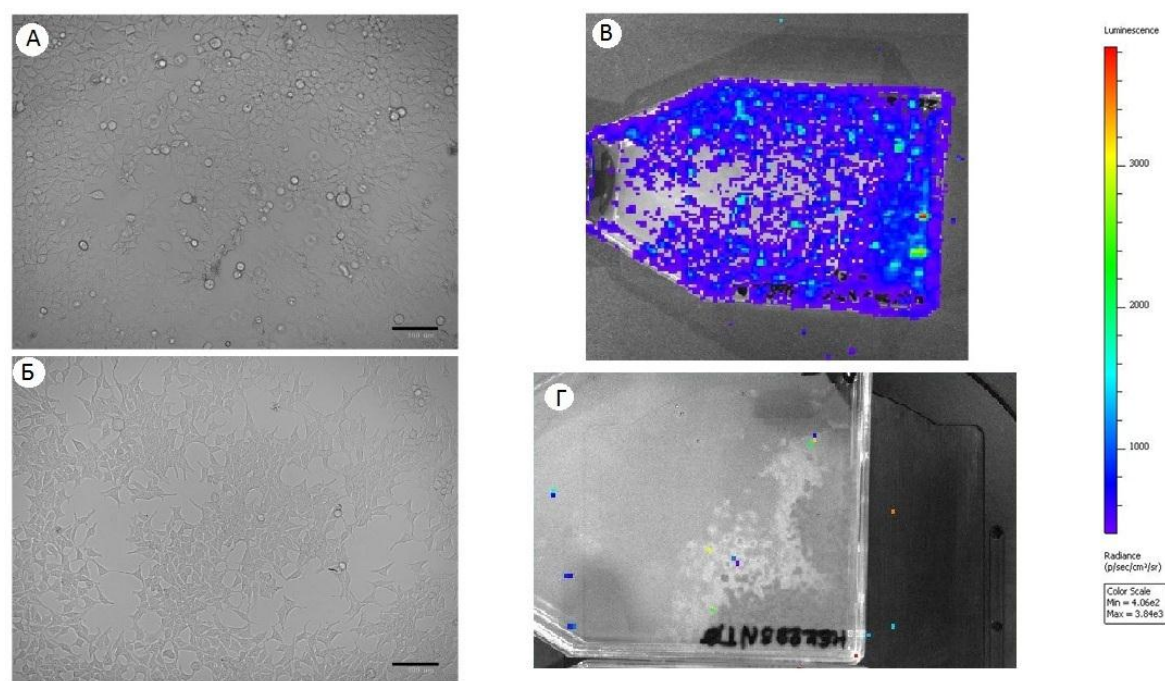
Все ДНК-конструкции для экспрессии в культуре клеток млекопитающих были созданы по единой схеме: в плазмиду pC-Katushka2S (Евроген) вместо кодирующей последовательности флуоресцентного белка Katushka2S были введены копии генов *nnh3h*, *nnhisps*, *nncph*, *npgA*, *rctal*, *hprab* или *hpac* под контроль промотора pCMV. Плазмиды, получившиеся в результате, были названы pC-N3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-npgA, pC-RcTAL, pC-NraB, pC-NraC, соответственно. Плазмида pC-Luz предоставлена Алексеем Котлобаем (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН). Ссылки на онлайн-последовательности данных плазмид приведены в **Приложении 3**.

#### **3.5.2 Измерение люминесценции временно трансфицированной культуры клеток НЕК293NT**

Для создания автономно биолюминесцентной культуры клеток млекопитающих мы провели одновременную трансфекцию плазмидами pC-Luz, pC-N3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-npgA, pC-RcTAL, pC-NraB и pC-NraC по протоколу, описанному в разделе 2.4.4.2 главы “Материалы и методы”. Через сутки после трансфекции мы

проанализировали состояние клеток (Рис. 25А-Б) и провели регистрацию люминесценции с помощью IVIS Spectrum СТ (Рис. 25В). В качестве контрольных клеток мы использовали линию НЕК293NT, трансфицированную всеми перечисленными выше плазмидами, кроме рС-RcTAL.

В целом, физиологическое состояние трансфицированных клеток было несколько хуже, чем у контрольных клеток, что может быть связано с токсическим влиянием основных или побочных продуктов введённого биохимического пути.



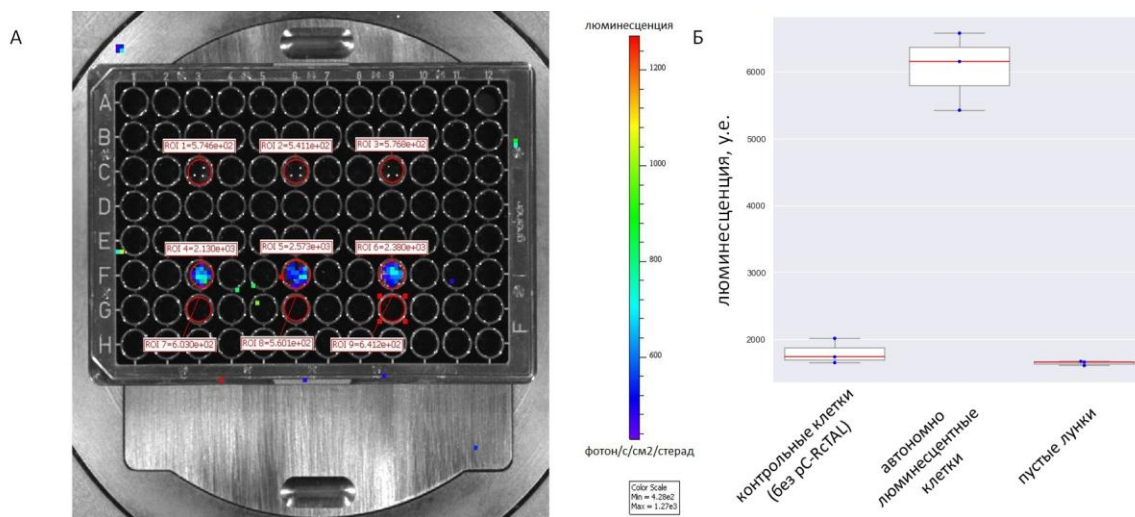
**Рисунок 25.** Изображения клеток НЕК293NT, полученных с помощью микроскопа ZOE Fluorescent Cell Imager (масштабный отрезок – 100 мкм) и IVIS Spectrum СТ. А – клетки через 24 часа после трансфекции плазмидами рС-Luz, рС-Н3Н, рС-HispS, рС-СРН, рС-nrgA, **рС-RcTAL**, рС-НраВ и рС-НраС, Б – клетки через 24 часа после трансфекции плазмидами рС-Luz, рС-Н3Н, рС-HispS, рС-СРН, рС-nrgA, рС-НраВ и рС-НраС, В – те же клетки, что и (А) при регистрации люминесцентного сигнала в течение 10 минут, binning 16 с помощью IVIS Spectrum СТ (псевдоцветами отмечена яркость свечения в фотонах/с/см<sup>2</sup>/стерадиан), Г - те же клетки, что и (Б) при регистрации люминесцентного сигнала в течение 10 минут, binning 16 с помощью IVIS Spectrum СТ.

Полученные с помощью IVIS Spectrum СТ изображения демонстрировали, что нам удалось достичь автономной люминесценции культуры клеток НЕК293NT, однако последующие попытки зарегистрировать люминесценцию тех же клеток спустя 10-20 минут после первого эксперимента при тех же настройках были неудачными: клетки не

испускали свечение, которое можно было бы зарегистрировать с помощью IVIS Spectrum CT. Мы высказали предположение, что это связано с изменением параметров окружающей среды, таких как температура и наличие CO<sub>2</sub>. В CO<sub>2</sub>-инкубаторе клетки находятся при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, тогда как температура столика IVIS Spectrum CT, будучи заявленной 37°C, при проверке с помощью термометра на самом деле представляла собой 28-30°C. Дополнительного насыщения углекислым газом камеры IVIS Spectrum CT не происходило, следовательно, уровень CO<sub>2</sub> был приблизительно таким же, как и в атмосферном воздухе, то есть не превышал 0,1%. Количественного измерения уровня CO<sub>2</sub> в камере IVIS Spectrum CT мы не производили.

Поскольку для свечения культуры клеток необходима слаженная работа сразу целого метаболического пути, включающего в себя не менее 5 стадий, то вероятность, что условия работы окажутся оптимальными для каждой из них (учитывая факт, что часть ферментов имеют происхождение из грибов *N. nambi* и *A. nidulans*, часть – из бактерий *R. capsulatus* и *E. coli*), невелика. Тем не менее, такое сочетание условий было достигнуто, как минимум, при начале съёмок люминесценции трансфицированной культуры. У нас не было простого способа отрегулировать температуру и содержание CO<sub>2</sub> в IVIS Spectrum CT, поэтому мы начали с того, что стабилизировали pH в среде для измерений люминесценции с помощью добавления HEPES до 20 mM (далее - IMEM). Кроме того, для получения более интенсивного сигнала люминесценции мы решили сконцентрировать клетки перед измерением.

Подобный протокол не позволил нам достичь длительной автономной люминесценции, однако мы смогли зарегистрировать свечение трансфицированных клеток полуколичественно (Рис. 26).



**Рисунок 26.** Измерение автономной люминесценции клеток HEK293NT, трансфицированных плазмидами pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-nrgA, pC-RcTAL, pC-HpaВ и pC-HpaС и сконцентрированных в среде для имиджинга MEM+NEPES. А – изображение, полученное с помощью IVIS Spectrum CT, выдержка 10 минут, binning 16, лунки С3, С6, С9 – контрольные клетки (трансфекция плазмидами pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-nrgA, pC-HpaВ и pC-HpaС), лунки F3, F6, F9 – автолюминесцентные клетки (трансфекция плазмидами pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-nrgA, **pC-RcTAL**, pC-HpaВ и pC-HpaС), лунки G3, G6, G9 – пустые; Б – количественное измерение люминесценции (фотоны/с/см<sup>2</sup>/стерадиан), на графике отмечены все измерения (синие точки) и медианное значение (красная линия).

На Рис. 26 видно, что автономная люминесценция клеток, трансфицированных плазмидами pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-nrgA, pC-RcTAL, pC-HpaВ и pC-HpaС превышает значения люминесценции как для контрольных клеток, так и для пустых лунок планшета, в котором проводились измерения, однако сигнал от автономно люминесцентных клеток не является высоким. Данные эксперименты стоит воспринимать как полуколичественные, поскольку значения автономной люминесценции в разных экспериментах варьировали, вероятно, в силу проведения экспериментов на временных трансфекциях. Таким образом, сравнение различных образцов можно осуществлять только в пределах одного и того же эксперимента и на данном этапе трудно говорить о строгих количественных измерениях.

Создание автономно люминесцентных клеток млекопитающих, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты, пока находится на начальном этапе и мы рассчитываем значительно улучшить данную систему введением дополнительных или альтернативных генов, а также за счет создания стабильных линий трансгенных клеток.



### **3.5.3 Подходы, использованные для увеличения яркости автономно биолюминесцентной культуры клеток млекопитающих**

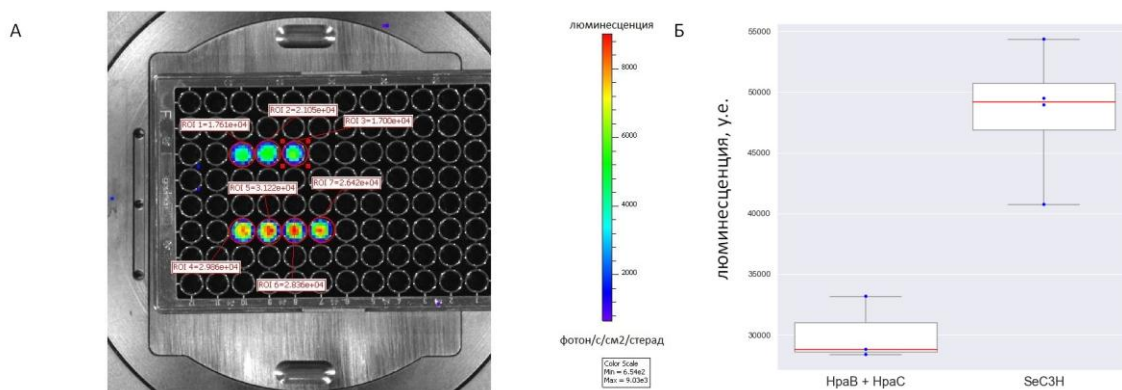
Несмотря на то, что мы достигли основной цели – показали пригодность генов цикла кофейной кислоты для создания автономно светящихся клеток млекопитающих, мы предположили, что можно увеличить их яркость. Для этого мы использовали несколько подходов, включающих как введение альтернативных ферментов, так и подбор оптимальных условий для регистрации люминесценции.

#### **3.5.3.1 Сравнение эффективности различных кумарат-3-гидроксилаз в автономно светящейся культуре клеток млекопитающих**

При временной трансфекции культуры клеток млекопитающих несколькими плазмидами одновременно существует вероятность, что не в каждую клетку может попасть хотя бы одна копия каждой из плазмид. Вторым недостатком временной трансфекции является то, что практически невозможно достичь уровня трансфекции 100% клеток даже при использовании единичной плазмиды. В сумме эти недостатки могут приводить к тому, что наблюдаемый эффект от трансфекции будет гораздо ниже ожидаемого, что с высокой вероятностью произошло и в описанных экспериментах по созданию автономно светящейся линии клеток млекопитающих НЕК293NT. К сожалению, нет простых путей решения ни одной из обеих приведённых выше проблем, однако в случае создания автономно люминесцентной культуры НЕК293NT можно снизить вклад первой из описанных проблем с помощью использования альтернативной кумарат-3-гидроксилазы, кодируемой одним геном, а не двумя (как в случае *hpaB* и *hpaC*). Мы выбрали ген *sec3h* (*sam5*), кодирующий кумарат-3-гидроксилазу *Saccharothrix espanaensis* [Strobel и др., 2012]. Данная последовательность была оптимизирована для использования в клетках *H. sapiens*, заказана синтетически и клонирована под контролем рCMV. Ссылку на онлайн-последовательность данной плазмиды можно найти в **Приложении 3**.

Мы трансфицировали клетки НЕК293NT параллельно набором плазмид рC-Luz, рC-H3H, рC-HispS, рC-CPH, рC-nrgA и рC-RcTAL, а также либо плазмидами рC-HpaB и рC-HpaC, либо плазмидой рC-SeC3H. Через 4 часа после трансфекции мы заменяли среду на DMEM, насыщенный тирозином, а через 24 часа концентрировали клетки в

среде ИМЕМ, насыщенной тирозином, как описано в разделе 2.4.4.3 главы “Материалы и методы” и проводили имиджинг с помощью IVIS Spectrum CT. Результаты имиджинга приведены на Рис. 27.



**Рисунок 27.** Различия в автономном свечении клеток HEK293NT, трансфицированных набором плазмид pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-npgA и pC-RcTAL (далее в описании и в панели Б не указываются), а также либо плазмидами pC-HpaB и pC-HpaC, либо плазмидой pC-SeC3H. А – люминесценция, зарегистрированная с помощью IVIS Spectrum CT, выдержка 10 минут, binning 16, лунки С3, С4, С5 – трансфекция плазмидами pC-HpaB и pC-HpaC, лунки F3, F4, F5, F6 – трансфекция плазмидой pC-SeC3H; Б – количественное измерение люминесценции (фотоны/с/см<sup>2</sup>/стерадиан), на графике отмечены все измерения (синие точки) и медианное значение (красная линия).

Несмотря на то, что данный эксперимент также стоит считать полуколичественным, на Рис. 27Б видно, что использование для трансфекции плазмиды pC-SeC3H приводит к более высоким значениям автономной люминесценции по сравнению с парой плазмид pC-HpaB и pC-HpaC, однако остаётся неизвестным, вклад какого из процессов оказывает большее влияние: более высокая вероятность попадания в трансфицированные клетки одновременно 7 плазмид вместо 8 (при использовании pC-SeC3H вместо пары pC-HpaB и pC-HpaC), либо более высокая эффективность кумарат-3-гидроксилазы из *S. espaniensis* по сравнению с кумарат-3-гидроксилазой *E. coli* в гетерологическом хозяине – культуре клеток млекопитающих HEK293NT. Ответ на этот вопрос ещё предстоит получить.

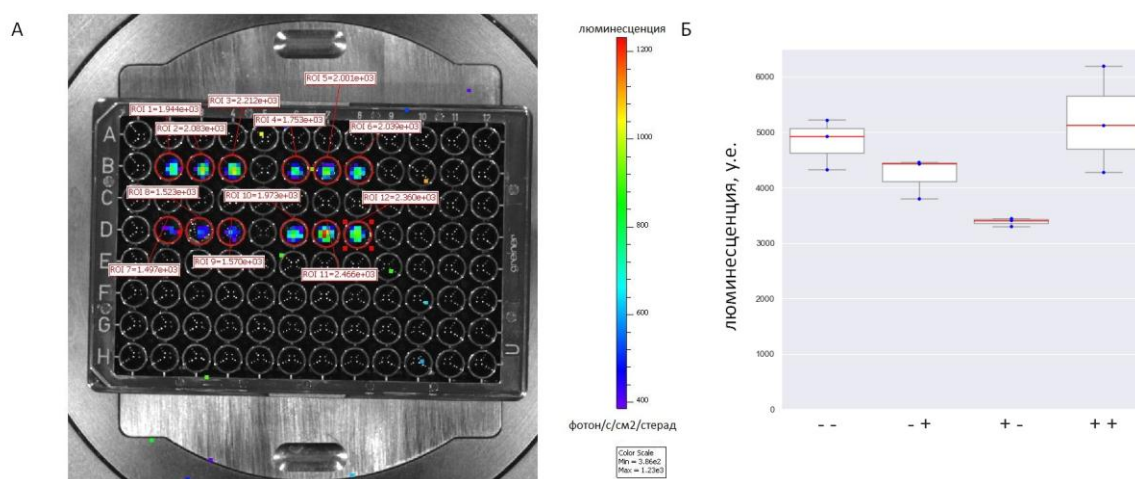
### 3.5.3.2 Оптимизация протокола регистрации люминесценции светящейся культуры клеток млекопитающих

Согласно описанию производителя, в составе сред DMEM и MEM M3024 присутствует добавленный тирозин в концентрациях 0,1 г/л и 0,05 г/л, соответственно. Предельная растворимость тирозина в воде при этом составляет 0,45 г/л в условиях физиологических значений pH (по описанию продукта T 3754 - порошок тирозина, Sigma Aldrich). Таким образом, содержание тирозина в питательных средах для клеток млекопитающих достаточно высоко, однако не достигает предельных значений растворимости этого вещества. Для оценки влияния добавленного тирозина на яркость свечения автономно люминесцентных клеток НЕК293NT мы провели следующий эксперимент: трансфицировали клетки в одинаковых условиях набором плазмид pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-npgA, pC-RcTAL и pC-SeC3H, через 4 часа после трансфекции части трансфицированных клеток мы заменили среду на fullDMEM, а части – на fullDMEM с тирозином, добавленным до насыщения. Через 24 часа после трансфекции мы сконцентрировали клетки, как описано в разделе 2.4.4.3 главы “Материалы и методы” и ресуспендировали часть образцов в среде IMEM, а часть – в среде IMEM с тирозином, добавленным до насыщения. Таким образом, мы получили 4 категории образцов, описание которых представлено в **Таблице 2**.

**Таблица 2.** Присутствие дополнительного тирозина в культуральной среде клеток НЕК293NT после трансфекции набором плазмид рС-Luz, рС-НЗН, рС-HispS, рС-CPH, рС-nrgA, рС-RcTAL и рС-SeC3H.

----- DMEM	— тирозин	+ тирозин
IMEM	Образец 1	Образец 2
— тирозин	Образец 3	Образец 4
+ тирозин		

Имиджинг образцов, описанных в **Таблице 2**, мы провели с помощью IVIS Spectrum CT. Результаты приведены на Рис. 28.



Видно, что добавление дополнительного тирозина не оказывает значительного влияния на яркость автономно люминесцентных клеток, поэтому предпочтение можно отдать более простому протоколу, при котором добавление тирозина в культуральные среды не производится.

### **3.5.3.3 Подбор гетерологической тирозин-аммоний-лиазы в автономно светящейся культуре клеток млекопитающих**

Нам удалось улучшить протекание этапа превращения кумаровой кислоты в кофейную с помощью замены гетерологической гетеродимерной кумарат-3-гидроксилазы из *E. coli* на фермент из *R. capsulatus*. Мы предположили, что подбор более эффективной тирозин-аммоний-лиазы также позволит увеличить яркость свечения культуры клеток HEK293NT, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты и вспомогательные гены. Для поиска альтернативных ферментов мы провели литературный анализ и остановились на тирозин-аммоний-лиазах из *S. espaniensis* [Strobel и др., 2012], *Flavobacterium johnsoniae* и *Herpetosiphon aurantiacus* (изоформа 1) [Jendresen и др., 2015], получивших впоследствии названия SeTAL, FjTAL и HaTAL1, соответственно. Данные последовательности были оптимизированы для использования в клетках *H. sapiens*, заказаны синтетически и клонированы под контролем рСМV. Ссылки на онлайн-последовательности данных плазмид можно найти в **Приложении 3**.

Мы планируем проверить эффективность данных тирозин-аммоний-лиаз в системе автономно светящихся клеток млекопитающих и отобрать наиболее эффективный фермент для дальнейшего использования.

## Заключение

Создание автономно биолюминесцентных организмов – относительно новое направление в молекулярной биологии. Для создания подобных организмов необходимо знать как биосинтетические превращения простых метаболитов в люциферин, так и обладать эффективными ферментами, способными катализировать эти превращения. Нам удалось открыть гены биосинтеза люциферина грибов, к которым относятся гены гиспидинсинтазы и гиспидин-3-гидроксилазы, катализирующие превращение кофейной кислоты в люциферин, а также ген кафеоилпируватгидролазы, превращающий оксилуциферин грибов в кофейную кислоту. Нам удалось подтвердить работоспособность всех трёх ферментов в гетерологических системах.

В данной работе мы стремились показать, что использование генов цикла кофейной кислоты, несомненно, является многообещающим подходом, открывающим ряд новых возможностей. Помимо подтверждения того факта, что гены цикла кофейной кислоты либо сами по себе (в случае их гетерологического использования в растениях), либо в сочетании со вспомогательными генами из других организмов (в случае гетерологического использования в дрожжах или культуре клеток млекопитающих) могут приводить к автономной люминесценции исследуемых объектов, мы также предлагаем ряд подходов к улучшению этих систем с помощью набора различных вспомогательных генов. Мы предполагаем, что последующее улучшение данной системы приведёт как к созданию ярких автономно люминесцентных гетерологических организмов из царств Растения, Животные и Грибы, так и позволит создать новые биотехнологические инструменты, такие как многоцветное автономно люминесцентное мечение, модельные автономно люминесцентные опухоли для исследования процессов метастазирования или проверки эффективности лекарств и другие.

## Выводы

1. Найдены гены ферментов биосинтеза люциферина грибов: гиспидинсинтазы *hisps*, гиспидин-3-гидроксилазы *h3h* и кафеоилпируватгидролазы *cpH*. В геномах люминесцентных видов высших грибов указанные гены образуют консервативный кластер, также содержащий ген люциферазы грибов *luc*.
2. Подтверждены функции продуктов данных генов при гетерологической экспрессии в модельном организме — дрожжах *Pichia pastoris*. Таким образом, найденные гены кодируют систему ферментов, необходимых и достаточных для обеспечения люминесценции грибов. Найденный биохимический каскад назван нами “цикл кофейной кислоты”.
3. Подобраны вспомогательные гены *tal*, *c3h*, *hpab* и *hpac*, продукты которых — тирозин-аммоний-лиаза (TAL) и кумарат-3-гидроксилаза (СЗН или гетеродимер НраВ/НраС) — способны катализировать превращение аминокислоты тирозина в предшественники люциферина грибов — кумаровую и кофейную кислоты, соответственно.
4. Созданы автономно биолюминесцентные дрожжи *P. pastoris*, экспрессирующие гены цикла кофейной кислоты и вспомогательные гены — *tal*, *hpab* и *hpac*.
5. Созданы автономно биолюминесцентные трансгенные растения *Nicotiana tabacum* и *N. benthamiana*, экспрессирующие гены цикла кофейной кислоты.
6. Проанализирована интенсивность свечения различных органов и тканей *N. tabacum* и *N. benthamiana* и её изменения во времени и пространстве; максимальным свечением обладают цветки, в целом интенсивность свечения растения выше в тёмное время суток.
7. С помощью временной трансфекции созданы автономно биолюминесцентные клетки млекопитающих НЕК293NT, экспрессирующие гены цикла кофейной кислоты и вспомогательные гены *rctal*, *hpab* и *hpac* или *rctal* и *sec3h*.

## Приложения

### Приложение 1. Праймеры, использованные для генотипирования растений *N. tabacum* и *N. benthamiana*, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты

Ген	Последовательности праймеров	Размер фрагмента
<i>nptII</i> (KanR)	5'- GCTATGACTGGGCACAACAGACAATC -3' 5'-TCCGAGTACGTGCTCGCTCGA -3'	381 п.о.
<i>nnluz</i>	5'-CAATAGCATTCCCAATTATCCGAAGAG-3' 5'- ACAATCTTACCAGCAGGATCGTTAGTCA-3'	691 п.о.
<i>nncph</i>	5'-GTAGAGAAGGTAAGACAATTCAAGCATACGA -3' 5'-TCTTCTCGAACTGTATTTGCGAGAGTTC-3'	775 п.о.
<i>nnhisps</i>	5'-TGGATGTATTTCTCGACACGGCTAGA-3' 5'-TCAGCTCTGTCCGATATGTTGAAGGA -3'	735 п.о.
<i>nnh3h</i>	5'-AGCATCAAAGGATGACTTGTTTCGAGT-3' 5'-GCTGAGTTAGAGCTCCTAAGCAAGGT-3'	465 п.о.

### Приложение 2. Ссылки на онлайн-карты плазмид, использованных для трансформации дрожжей *Pichia pastoris*

Название плазмиды	Ссылка на онлайн-карту
GAP-pPic9-H3H	<a href="https://benchling.com/s/seq-MLPZfJEr9HiOr3jCgGUQ">https://benchling.com/s/seq-MLPZfJEr9HiOr3jCgGUQ</a>
pGap-Zeo-HispS	<a href="https://benchling.com/s/seq-HkBB8PHnUei0IF7f79XA">https://benchling.com/s/seq-HkBB8PHnUei0IF7f79XA</a>
pGap-Bsd-npgA	<a href="https://benchling.com/s/seq-Ug4lskl3dodcyupow1dE">https://benchling.com/s/seq-Ug4lskl3dodcyupow1dE</a>
pGap-Kan-CPH	<a href="https://benchling.com/s/seq-SvRYwTNqpbRjelwAfB9N">https://benchling.com/s/seq-SvRYwTNqpbRjelwAfB9N</a>
pGap-Hyg-HpaB	<a href="https://benchling.com/s/seq-XWrwIcakyzg0JgU8vgMH">https://benchling.com/s/seq-XWrwIcakyzg0JgU8vgMH</a>
pGap-Hyg-HpaC	<a href="https://benchling.com/s/seq-PWQMPwgYpXBZXfWzPsS4">https://benchling.com/s/seq-PWQMPwgYpXBZXfWzPsS4</a>
pGap-Hyg-RcTAL	<a href="https://benchling.com/s/seq-WOdkMctElkd9A8m3ZI8Y">https://benchling.com/s/seq-WOdkMctElkd9A8m3ZI8Y</a>



**Приложение 3. Ссылки на онлайн-карты плазмид, использованных для трансфекции культуры клеток млекопитающих**

<b>Название плазмиды</b>	<b>Ссылка на онлайн-карту</b>
pC-Luz	<a href="https://benchling.com/s/seq-ESmF6D4h2NnFR3BdwZdR">https://benchling.com/s/seq-ESmF6D4h2NnFR3BdwZdR</a>
pC-H3H	<a href="https://benchling.com/s/seq-VvsFIIRPu4nQFjjGmWos">https://benchling.com/s/seq-VvsFIIRPu4nQFjjGmWos</a>
pC-CPH	<a href="https://benchling.com/s/seq-W8B1rlZcKJiX4O070Q5v">https://benchling.com/s/seq-W8B1rlZcKJiX4O070Q5v</a>
pC-HispS	<a href="https://benchling.com/s/seq-eAaW5jRriRRSxQElvrtn">https://benchling.com/s/seq-eAaW5jRriRRSxQElvrtn</a>
pC-npgA	<a href="https://benchling.com/s/seq-1wu1jAVWBi166NtBcXGq">https://benchling.com/s/seq-1wu1jAVWBi166NtBcXGq</a>
pC-RcTAL	<a href="https://benchling.com/s/seq-rr82wGh6ZWhKvu930tBL">https://benchling.com/s/seq-rr82wGh6ZWhKvu930tBL</a>
pC-HpaB	<a href="https://benchling.com/s/seq-Q2VvYrnWDQuK1F0gVCPK">https://benchling.com/s/seq-Q2VvYrnWDQuK1F0gVCPK</a>
pC-HpaC	<a href="https://benchling.com/s/seq-SmvSNL2nWOfaF7IvzJZu">https://benchling.com/s/seq-SmvSNL2nWOfaF7IvzJZu</a>
pC-SeC3H	<a href="https://benchling.com/s/seq-ENjx2Pb7dYmGx4ien304">https://benchling.com/s/seq-ENjx2Pb7dYmGx4ien304</a>
pC-SeTAL	<a href="https://benchling.com/s/seq-uxwEsYfGVWGJzhrMstrH">https://benchling.com/s/seq-uxwEsYfGVWGJzhrMstrH</a>
pC-FjTAL	<a href="https://benchling.com/s/seq-hq2mnEdeKvkv69xTv8UO">https://benchling.com/s/seq-hq2mnEdeKvkv69xTv8UO</a>
pC-HaTAL1	<a href="https://benchling.com/s/seq-zTf4ZHTBcnhYHV3hNR9h">https://benchling.com/s/seq-zTf4ZHTBcnhYHV3hNR9h</a>

**Приложение 4. Ссылка на онлайн-карту плазмиды, использованной для трансформации агробактерий и последующей трансформации растений**

<b>Название плазмиды</b>	<b>Ссылка на онлайн-карту</b>
pHispS-H3H-Luz-CPH	<a href="https://benchling.com/s/seq-H9DLksUzMsRpPmwTssls">https://benchling.com/s/seq-H9DLksUzMsRpPmwTssls</a>

### Благодарности

- моему научному руководителю Ямпольскому Илье Викторовичу
- моим оппонентам Лосю Дмитрию Анатольевичу и Остерману Илье Андреевичу
- представителю ведущей организации МФТИ Лазареву Василию Николаевичу
- моим коллегам Саркисяну Карену, Береговой Ксении, Шаховой Екатерине, Митюшкиной Татьяне, Мишину Александру, Котлобаю Алексею, Царьковой Александре, Осиповой Зинаиде, Каратаевой Татьяне, Чепурных Татьяне, Гороховатскому Андрею, Фахрануровой Лилии, Мокрушиной Юлиане, Абакумову Максиму
- а также всем, кто мотивировал меня на написание данной работы вопросами: “Ну что, когда защищаешься?”

**Список литературы**

1. Котлобай А.А. Поиск, клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов. // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва. 2019.
2. Aakvik T., Degnes K.F., Dahlsrud R., Schmidt F., Dam R., Yu L., Völker U., Ellingsen T.E., Valla S. A plasmid RK2-based broad-host-range cloning vector useful for transfer of metagenomic libraries to a variety of bacterial species. // FEMS Microbiol Lett. 2009. Т. 96. №2. С. 149-158.
3. Ajikumar P.K., Xiao W.H., Tyo K.E., Wang Y., Simeon F., Leonard E., Mucha O., Phon T.H., Pfeifer B., Stephanopoulos G. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. // Science. 2010. Т. 330. №6000. С. 70-74.
4. Alberti F., Foster G.D., Bailey A.M. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. // Appl Microbiol Biotechnol. 2017. Т. 101. №2 С.493-500.
5. Alberti F., Khairudin K., Venegas E.R., Davies J.A., Hayes P.M., Willis C.L., Bailey A.M., Foster G.D. Heterologous expression reveals the biosynthesis of the antibiotic pleuromutilin and generates bioactive semi-synthetic derivatives. // Nat Commun. 2017. Т. 8. №1. С. 1831.
6. Amiri P., Shahpiri A., Asadollahi M.A., Momenbeik F., Partow S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for linalool production. // Biotechnol Lett. 2016. Т. 38. №3. С. 503-508.
7. Andersen M.R., Nielsen J.B., Klitgaard A., Petersen L.M., Zachariasen M., Hansen T.J., Blicher L.H., Gottfredsen C.H., Larsen T.O., Nielsen K.F., Mortensen U.H. Accurate prediction of secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2013. Т. 10. №1. E99-107.
8. Anyaogu D.C., Mortensen U.H. Heterologous production of fungal secondary metabolites in *Aspergilli*. // Front Microbiol. 2015. Т. 6. Ст. 77
9. Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G.M., Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. // Nat Genet. 2000. Т.25. №1. С.25-29.

10. Avalos J.L., Fink G.R., Stephanopoulos G. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. // Nat Biotechnol. 2013. T. 31. №4. C. 335-341.
11. Aziz R.K., Breitbart M., Edwards R.A. Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature. // Nucleic Acids Res. 2010. T. 38. №13. C. 4207-4217.
12. Bairoch A. The ENZYME database in 2000. // Nucleic Acids Res. 2000. T.28. №1. C.304-305.
13. Bailey A.M., Alberti F., Kilaru S., Collins C.M., de Mattos-Shipley K., Hartley A.J., Hayes P., Griffin A., Lazarus C.M., Cox R.J., Willis C.L., O'Dwyer K., Spence D.W., Foster G.D. // Identification and manipulation of the pleuromutilin gene cluster from *Clitopilus passeckerianus* for increased rapid antibiotic production. Sci Rep. 2016. T. 6. Cт. 25202.
14. Baltz R.H. *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. // J Ind Microbiol Biotechnol. 2010. T. 37. № 8. C. 759-772.
15. Baral B., Akhgari A., Metsä-Ketelä M. Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. // Synth Syst Biotechnol. 2018. T. 3. №3. C. 163-178.
16. Barbesgaard P., Heldt-Hansen H.P., Diderichsen B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. Appl Microbiol Biotechnol. 1992. T.36. №5. C. 569-572.
17. Bassalo M.C., Garst A.D., Halweg-Edwards A.L., Grau W.C., Domaille D.W., Mutalik V.K., Arkin A.P., Gill R.T. Rapid and Efficient One-Step Metabolic Pathway Integration in *E. coli*. // ACS Synth Biol. 2016. T. 5. №7. C. 561-568.
18. Bayer T.S., Widmaier D.M., Temme K., Mirsky E.A., Santi D.V., Voigt C.A. Synthesis of methyl halides from biomass using engineered microbes. // J Am Chem Soc. 2009. T. 131. №18. C. 6508-6515.
19. Bentley F.K., Zurbriggen A., Melis A. Heterologous expression of the mevalonic acid pathway in cyanobacteria enhances endogenous carbon partitioning to isoprene. // Mol Plant. 2014. T. 7. № 1. C. 71-86.
20. Blin K., Shaw S., Steinke K., Villebro R., Ziemert N., Lee S.Y., Medema M.H., Weber T. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. // Nucleic Acids Res. 2019. T. 47. W1. W81-W87.
21. Boddy C.N. Bioinformatics tools for genome mining of polyketide and non-ribosomal peptides. // J Ind Microbiol Biotechnol. 2014. T. 41. №2. C. 443-450.

22. Bode H.B., Bethe B., Höfs R., Zeeck A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. // *Chembiochem*. 2002. T. 3. №7. 619-627.
23. Boeckmann B., Bairoch A., Apweiler R., Blatter M.C., Estreicher A., Gasteiger E., Martin M.J., Michoud K., O'Donovan C., Phan I., Pilbout S., Schneider M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. // *Nucleic Acids Res*. 2003. T.31. №1. C.365-370.
24. Boghigian B.A., Zhang H., Pfeifer B.A. Multi-factorial engineering of heterologous polyketide production in *Escherichia coli* reveals complex pathway interactions. // *Biotechnol Bioeng*. 2011. T. 108. №6. C. 1360-1371.
25. Bongaerts J., Krämer M., Müller U., Raeven L., Wubbolts M. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. // *Metab Eng*. 2001. T. 3. №4. C. 289-300.
26. Brakhage A.A. Regulation of fungal secondary metabolism. // *Nat Rev Microbiol*. 2013. T. 11. №1. C. 21-32.
27. Brown S., Clastre M., Courdavault V., O'Connor S.E. De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015. T. 112. №11. C. 3205-10.
28. Callahan B., Thattai M., Shraiman B.I. Emergent gene order in a model of modular polyketide synthases. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. T. 106. №46. C. 19410-19415.
29. Campodonico M.A., Andrews B.A., Asenjo J.A., Palsson B.O., Feist A.M. Generation of an atlas for commodity chemical production in *Escherichia coli* and a novel pathway prediction algorithm, GEM-Path. // *Metab Eng*. 2014. T.25. C.140-158.
30. Carbonell P., Fichera D., Pandit S.B., Faulon J.L. Enumerating metabolic pathways for the production of heterologous target chemicals in chassis organisms. // *BMC Syst Biol*. 2012. T.6. C.10.
31. Carlsen S., Ajikumar P.K., Formenti L.R., Zhou K., Phon T.H., Nielsen M.L., Lantz A.E., Kielland-Brandt M.C., Stephanopoulos G. Heterologous expression and characterization of bacterial 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013. T. 97. №13. C. 5753-5769.
32. Caspi R., Billington R., Fulcher C.A., Keseler I.M., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., Midford P.E., Ong Q., Ong W.K., Paley S., Subhraveti P., Karp P.D.

- The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. // *Nucleic Acids Res.* 2018. T.46(D1). D633-D639.
33. Cavalieri R.L., Havell E.A., Vilcek J., Pestka S. Synthesis of human interferon by *Xenopus laevis* oocytes: two structural genes for interferons in human cells. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977. T. 74. №8. C.3287-3291.
34. Chang A., Scheer M., Grote A., Schomburg I., Schomburg D. BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. // *Nucleic Acids Res.* 2009. T.37(База данных). D588-92.
35. Chantrenne H., Marbaix G. Translation of 9S ARN, messengers of hemoglobin, in heterologous systems. // *Biochimie.* 1972. T. 54. №1. C.1-5.
36. Chaturachai S., Furusawa C., Shimizu H. An in silico platform for the design of heterologous pathways in nonnative metabolite production. // *BMC Bioinformatics.* 2012. T.13. C.93-104.
37. Chaturachai S., Furusawa C., Shimizu H. ArtPathDesign: rational heterologous pathway design system for the production of nonnative metabolites.
38. Chávez R., Fierro F., García-Rico R.O., Vaca I. Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. // *Front Microbiol.* 2015. T. 6. C. 903.
39. Chen G.E., Canniffe D.P., Barnett S.F.H., Hollingshead S., Brindley A.A., Vasilev C., Bryant D.A., Hunter C.N. Complete enzyme set for chlorophyll biosynthesis in *Escherichia coli*. *Sci Adv.* 2018. T. 4. №. 1. eaaq1407.
40. Chen J., Fu G., Gai Y., Zheng P., Zhang D., Wen J. Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression. // *Microb Cell Fact.* 2015. T. 14. Cт. 92.
41. Chen J., Zeng X., Yang Y.L., Xing Y.M., Zhang Q., Li J.M., Ma K., Liu H.W., Guo S.X. Genomic and transcriptomic analyses reveal differential regulation of diverse terpenoid and polyketides secondary metabolites in *Hericium erinaceus*. // *Sci Rep.* 2017 T.7. №1. C.10151.
42. Chen Y., Daviet L., Schalk M., Siewers V., Nielsen J. Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism. // *Metab Eng.* 2013. T. 15. C. 48-54.

43. Chen W.H., Qin Z.J., Wang J., Zhao G.P. The MASTER (methylation-assisted tailorable ends rational) ligation method for seamless DNA assembly. // *Nucleic Acids Res.* 2013. T. 41. №8. e93.
44. Chiang Y.M., Oakley C.E., Ahuja M., Entwistle R., Schultz A., Chang S.L., Sung C.T., Wang C.C., Oakley B.R. An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. // *J Am Chem Soc.* 2013. T. 135. №20. C. 7720-7731.
45. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. // *Physiol Rev.* 2010. T. 90. №3. C. 1103-1163.
46. Chung Y.M., Wei C.K., Chuang D.W., El-Shazly M., Hsieh C.T., Asai T., Oshima Y., Hsieh T.J., Hwang T.L., Wu Y.C., Chang F.R. An epigenetic modifier enhances the production of anti-diabetic and anti-inflammatory sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii*. // *Bioorg Med Chem.* 2013. T. 21. №13. C. 3866-3872.
47. Clevenger K.D., Bok J.W., Ye R., Miley G.P., Verdán M.H., Velk T., Chen C., Yang K., Robey M.T., Gao P., Lamprecht M., Thomas P.M., Islam M.N., Palmer J.M., Wu C.C., Keller N.P., Kelleher N.L. A scalable platform to identify fungal secondary metabolites and their gene clusters. // *Nat Chem Biol.* 2017. T. 13. №8. C. 895-901.
48. Cochrane R.V., Sanichar R., Lambkin G.R., Reiz B., Xu W., Tang Y., Vederas J.C. Production of New Cladosporin Analogues by Reconstitution of the Polyketide Synthases Responsible for the Biosynthesis of this Antimalarial Agent. // *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016. T. 55. №2. C. 664-668.
49. Craig J.W., Chang F.Y., Kim J.H., Obiajulu S.C., Brady S.F. Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse proteobacteria. // *Appl Environ Microbiol.* 2010. T. 76. №5. C. 1633-1641.
50. Craig N.L. Unity in transposition reactions. // *Science.* 1995. T. 270. №5234. C. 253-254.
51. Cregg J.M. *Pichia protocols (Methods in Molecular Biology 389)*. // Humana Press. 2007. T. 389.
52. Dahl R.H., Zhang F., Alonso-Gutierrez J., Baidoo E., Batth T.S., Redding-Johanson A.M., Petzold C.J., Mukhopadhyay A., Lee T.S., Adams P.D., Keasling J.D. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters. // *Nat Biotechnol.* 2013. T. 31. №11. C. 1039-1046.

53. Davison J., al Fahad A., Cai M., Song Z., Yehia S.Y., Lazarus C.M., Bailey A.M., Simpson T.J., Cox R.J. Genetic, molecular, and biochemical basis of fungal tropolone biosynthesis. // Proc Natl Acad Sci USA. 2012. T.109. №20. C.7642-7647.
54. de Jong B.W., Shi S., Siewers V., Nielsen J. Improved production of fatty acid ethyl esters in *Saccharomyces cerevisiae* through up-regulation of the ethanol degradation pathway and expression of the heterologous phosphoketolase pathway. // Microb Cell Fact. 2014. T. 13. №1. Cт. 39.
55. Delépine B., Duigou T., Carbonell P., Faulon J.L. RetroPath2.0: A retrosynthesis workflow for metabolic engineers. // Metab Eng. 2018. T.45. C.158-170.
56. Demain A.L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. // J Ind Microbiol Biotechnol. 2014. T. 4. №2. C. 185-201.
57. Demain A.L., Elander RP. The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1999. T. 75. №1-2. C. 5-19.
58. Dhakal D., Sohng J.K., Pandey R.P. Engineering actinomycetes for biosynthesis of macrolactone polyketides. // Microb Cell Fact. 2019. T. 18. №1. C. 137.
59. Du J., Yuan Y., Si T., Lian J., Zhao H. Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering. // Nucleic Acids Res. 2012. T. 40. №18. e142.
60. Dueber J.E., Wu G.C., Malmirchegini G.R., Moon T.S., Petzold C.J., Ullal A.V., Prather K.L., Keasling J.D. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. // Nat Biotechnol. 2009. T. 27. №8. C. 753-759.
61. Dymond J.S., Richardson S.M., Coombes C.E., Babatz T., Muller H., Annaluru N., Blake W.J., Schwerzmann J.W., Dai J., Lindstrom D.L., Boeke A.C., Gottschling D.E., Chandrasegaran S., Bader J.S., Boeke J.D. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. // Nature. 2011. T. 477. 37365. C. 471-476.
62. Engler C., Youles M., Gruetzner R., Ehnert T.M., Werner S., Jones J.D., Patron N.J., Marillonnet S. A golden gate modular cloning toolbox for plants. // ACS Synth Biol. 2014. T. 3. №11. 839-843.
63. Farré G., Blancquaert D., Capell T., Van Der Straeten D., Christou P., Zhu C. Engineering complex metabolic pathways in plants. // Annu Rev Plant Biol. 2014. T. 65. C. 187-223.



64. Formighieri C., Melis A. Carbon partitioning to the terpenoid biosynthetic pathway enables heterologous  $\beta$ -phellandrene production in *Escherichia coli* cultures. // Arch Microbiol. 2014. T. 196. №12. C. 853-861.
65. Francis K.P., Joh D., Bellinger-Kawahara C., Hawkinson M.J., Purchio T.F., Contag P.R. Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel luxABCDE construct. // Infect Immun. 2000. T. 68. №6. C. 3594-3600.
66. François I.E., De Bolle M.F., Dwyer G., Goderis I.J., Woutors P.F., Verhaert P.D., Proost P., Schaaper W.M., Cammue B.P., Broekaert W.F. Transgenic expression in *Arabidopsis* of a polyprotein construct leading to production of two different antimicrobial proteins. // Plant Physiol. 2002. T. 128. №4. C. 1346-1358.
67. Fricke J., Blei F., Hoffmeister D. Enzymatic Synthesis of Psilocybin. // Angew Chem Int Ed Engl. 2017. T. 56. №40. C. 12352-12355.
68. Fu J., Wenzel S.C., Perlova O., Wang J., Gross F., Tang Z., Yin Y., Stewart A.F., Müller R., Zhang Y. Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition. // Nucleic Acids Res. 2008. T. 36. №17. e113.
69. Fuentes P., Zhou F., Erban A., Karcher D., Kopka J., Bock R. A new synthetic biology approach allows transfer of the entire metabolic pathway from a medicinal plant to a biomass crop. // eLife. 2016. T.5. C. 18232-18237.
70. Fujii R., Minami A., Tsukagoshi T., Sato N., Sahara T., Ohgiya S., Gomi K., Oikawa H. Total biosynthesis of diterpene aphidicolin, a specific inhibitor of DNA polymerase  $\alpha$ : heterologous expression of four biosynthetic genes in *Aspergillus oryzae*. // Biosci Biotechnol Biochem. 2011. T. 75. №9. C. 1813-1817.
71. Galanie S., Thodey K., Trenchard I.J., Filsinger Interrante M., Smolke C.D. Complete biosynthesis of opioids in yeast. // Science. 2015. T.349. №6252. C.1095-100.
72. Gao L., Cai M., Shen W., Xiao S., Zhou X., Zhang Y. Engineered fungal polyketide biosynthesis in *Pichia pastoris*: a potential excellent host for polyketide production. // Microb Cell Fact. 2013. T. 12. C. 77.
73. Gassler T., Sauer M., Gasser B., Egermeier M., Troyer C., Causon T., Hann S., Mattanovich D., Steiger M.G. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO<sub>2</sub>. // Nat Biotechnol. 2020. T. 38. №2. C. 210-216.

74. Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison C.A. 3rd, Smith H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. // *Nat Methods*. 2009. T. 6. №5. C. 343-345.
75. Gomez-Escribano J.P., Bibb M.J. Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. // *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2014. T.41. №2. C.425-431.
76. Gnanasekaran T., Vavitsas K., Andersen-Ranberg J., Nielsen A.Z., Olsen C.E., Hamberger B., Jensen P.E. Heterologous expression of the isopimaric acid pathway in *Nicotiana benthamiana* and the effect of N-terminal modifications of the involved cytochrome P450 enzyme. // *J Biol Eng*. 2015. T. 9. Ст. 24.
77. Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. // *J Gen Virol*. 1977. T. 36. №1. C. 59-74.
78. Gregor C., Pape J.K., Gwosch K.C., Gilat T., Sahl S.J., Hell S.W. Autonomous bioluminescence imaging of single mammalian cells with the bacterial bioluminescence system. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019. T. 116. №52. C. 26491-26496.
79. Grigoriev I.V., Nikitin R., Haridas S., Kuo A., Ohm R., Otilar R., Riley R., Salamov A., Zhao X., Korzeniewski F., Smirnova T., Nordberg H., Dubchak I., Shabalov I. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. // *Nucleic Acids Res*. 2014. T. 42. (Выпуск базы данных). D699-704.
80. Gross F., Luniak N., Perlova O., Gaitatzis N., Jenke-Kodama H., Gerth K., Gottschalk D., Dittmann E., Müller R. Bacterial type III polyketide synthases: phylogenetic analysis and potential for the production of novel secondary metabolites by heterologous expression in pseudomonads. // *Arch Microbiol*. 2006. T. 185. № 1. C. 28-38.
81. Hartner F.S., Glieder A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. // *Microb Cell Fact*. 2006. T. 5. C. 39.
82. Hawkins K.M., Smolke C.D. Production of benzyloquinoline alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Nat Chem Biol*. 2008. T. 4. №9. 564-73.
83. Heneghan M.N., Yakasai A.A., Halo L.M., Song Z., Bailey A.M., Simpson T.J., Cox R.J., Lazarus C.M. First heterologous reconstruction of a complete functional fungal biosynthetic multigene cluster. // *Chembiochem*. 2010. T. 11. №11. C. 1508-1512.

84. Hoefgen S., Lin J., Fricke J., Stroe M.C., Mattern D.J., Kufs J.E., Hortschansky P., Brakhage A.A., Hoffmeister D., Valiante V. Facile assembly and fluorescence-based screening method for heterologous expression of biosynthetic pathways in fungi. // *Metab Eng.* 2018. T. 48. C. 44-51.
85. Hu Z., Hopwood D.A., Hutchinson C.R. Enhanced heterologous polyketide production in *Streptomyces* by exploiting plasmid co-integration. // *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2003. T. 30. №8. C. 516-522.
86. Huerta-Cepas J., Szklarczyk D., Forslund K., Cook H., Heller D., Walter M.C., Rattei T., Mende D.R., Sunagawa S., Kuhn M., Jensen L.J., von Mering C., Bork P. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. // *Nucleic Acids Res.* 2016. T.44(D1). D286-293.
87. Huo L., Hug J.J., Fu C., Bian X., Zhang Y., Müller R. Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways. // *Nat Prod Rep.* 2019. T. 36. №10. C. 1412-1436.
88. Hwang E.I., Kaneko M., Ohnishi Y., Horinouchi S. Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. // *Appl Environ Microbiol.* 2003. T. 69. №5. C. 2699-2706.
89. Ikram N.K., Zhan X., Pan X.W., King B.C., Simonsen H.T. Stable heterologous expression of biologically active terpenoids in green plant cells. // *Front Plant Sci.* 2015. T. 6. C. 129.
90. Imai Y., Meyer K.J., Iinishi A., Favre-Godal Q., Green R., Manuse S., Caboni M., Mori M., Niles S., Ghiglieri M., Honrao C., Ma X., Guo J.J., Makriyannis A., Linares-Otoya L., Böhringer N., Wuisan Z.G., Kaur H., Wu R., Mateus A., Typas A., Savitski M.M., Espinoza J.L., O'Rourke A., Nelson K.E., Hiller S., Noinaj N., Schäberle T.F., D'Onofrio A., Lewis K. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. // *Nature.* 2019. T. 576. №7787. C. 459-464.
91. Iverson S.V., Haddock T.L., Beal J., Densmore D.M. CIDAR MoClo: Improved MoClo Assembly Standard and New *E. coli* Part Library Enable Rapid Combinatorial Design for Synthetic and Traditional Biology. // *ACS Synth Biol.* 2016. T. 5. №1. C. 99-103.
92. Jeandet P., Delaunois B., Aziz A., Donnez D., Vasserot Y., Cordelier S., Courot E. Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol. // *J Biomed Biotechnol.* 2012. T.2012. Cт. 579089.

93. Jendresen C.B., Stahlhu S.G., Li M., Gaspar P., Siedler S., Förster J., Maury J., Borodina I., Nielsen A.T.. Highly Active and Specific Tyrosine Ammonia-Lyases from Diverse Origins Enable Enhanced Production of Aromatic Compounds in Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. // *Appl Environ Microbiol*. 2015. T. 81. №13. C. 4458–4476.
94. Jung W.S., Kim E., Yoo Y.J., Ban Y.H., Kim E.J., Yoon Y.J. Characterization and engineering of the ethylmalonyl-CoA pathway towards the improved heterologous production of polyketides in *Streptomyces venezuelae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014. T. 98. №8. C. 3701-3713.
95. Kanehisa M., Araki M., Goto S., Hattori M., Hirakawa M., Itoh M., Katayama T., Kawashima S., Okuda S., Tokimatsu T., Yamanishi Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. // *Nucleic Acids Res*. 2008. T.36(Выпуск Database). D480-484.
96. Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M., Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. // *Nucleic Acids Res*. 2016. T.44(D1). D457-D462.
97. Kaneko M., Hwang E.I., Ohnishi Y., Horinouchi S. Heterologous production of flavanones in *Escherichia coli*: potential for combinatorial biosynthesis of flavonoids in bacteria. // *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2003. T. 30. №8. C. 456-461.
98. Kapust R.B., Waugh D.S. Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease. // *Protein Expr Purif*. 2000. T. 19. №2. C. 312-318.
99. Kaskova Z.M., Dörr F.A., Petushkov V.N., Purtov K.V., Tsarkova A.S., Rodionova N.S., Mineev K.S., Guglya E.B., Kotlobay A., Baleeva N.S., Baranov M.S., Arseniev A.S., Gitelson J.I., Lukyanov S., Suzuki Y., Kanie S., Pinto E., Di Mascio P., Waldenmaier H.E., Pereira T.A., Carvalho R.P., Oliveira A.G., Oba Y., Bastos E.L., Stevani C.V., Yampolsky I.V. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. // *Sci Adv*. 2017. T. 3. №4. e1602847.
100. Kaskova Z.M., Tsarkova A.S., Yampolsky I.V. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. // *Chem Soc Rev*. 2016. T. 45. №21. C. 6048-6077.
101. Kawamata S., Shimoharai K., Imura Y., Ozaki M., Ichinose Y., Shiraishi T., Kunoh H., Yamada T. Temporal and spatial pattern of expression of the pea phenylalanine ammonia-lyase gene1 promoter in transgenic tobacco. // *Plant Cell Physiol*. 1997. T. 38. №7. C. 792-803.

102. Kealey J.T., Liu L., Santi D.V., Betlach M.C., Barr P.J. Production of a polyketide natural product in nonpolyketide-producing prokaryotic and eukaryotic hosts. Production of a polyketide natural product in nonpolyketide-producing prokaryotic and eukaryotic hosts. // Proc Natl Acad Sci U S A. 1998. T.95. №2. C.505-509.
103. Keller N.P., Turner G., Bennett J.W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. // Nat Rev Microbiol. 2005. T. 3. №12. C. 937-947.
104. Khaldi N., Seifuddin F.T., Turner G., Haft D., Nierman W.C., Wolfe K.H., Fedorova N.D. SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. // Fungal Genet Biol. 2010. T. 47. №9. C. 736-741.
105. Kim J., Yi G.S. PKMiner: a database for exploring type II polyketide synthases. // BMC Microbiol. 2012. T. 12. Ст. 169.
106. Kim J.H., Lee S.R., Li L.H., Park H.J., Park J.H., Lee K.Y., Kim M.K., Shin B.A., Choi S.Y. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. // PLoS One. 2011. T. 6. №4. e18556.
107. Kim J.M., Song H.Y., Choi H.J., So K.K., Kim D.H., Chae K.S., Han D.M., Jahng K.Y. Characterization of NpgA, a 4'-phosphopantetheinyl transferase of *Aspergillus nidulans*, and evidence of its involvement in fungal growth and formation of conidia and cleistothecia for development. // J Microbiol. 2015. T. 53. №1. C. 21-31.
108. Kim S.S. Building Triketide  $\alpha$ -Pyrone-Producing Yeast Platform Using Heterologous Expression of Sporopollenin Biosynthetic Genes. J Microbiol Biotechnol. 2015. T. 25. №11. C. 1796-1800.
109. Kishimoto S., Sato M., Tsunematsu Y., Watanabe K. Evaluation of Biosynthetic Pathway and Engineered Biosynthesis of Alkaloids. // Molecules. 2016. T. 21. №8. pii: E1078.
110. Kiviharju K., Salonen K., Moilanen U., Eerikäinen T. Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors. // J Ind Microbiol Biotechnol. 2008. T. 35. №7. C. 657-665.
111. Komatsu M., Uchiyama T., Omura S., Cane D.E., Ikeda H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. // Proc Natl Acad Sci USA. 2010. T.107. №6. C.2646-2651.

112. Lazarus C.M., Williams K., Bailey A.M. Reconstructing fungal natural product biosynthetic pathways. // Nat Prod Rep. 2014 T. 31. №10. C.1339-1347.
113. Lee M.E., DeLoache W.C., Cervantes B., Dueber J.E. A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. // ACS Synth Biol. 2015. T. 4. №9. 975-986.
114. Lee N., Hwang S., Lee Y., Cho S., Palsson B., Cho B.K. Synthetic Biology Tools for Novel Secondary Metabolite Discovery in *Streptomyces*. // J Microbiol Biotechnol. 2019. T. 29. №5. C. 667-686.
115. Lee T.S., Krupa R.A., Zhang F., Hajimorad M., Holtz W.J., Prasad N., Lee S.K., Keasling J.D. BglBrick vectors and datasheets: A synthetic biology platform for gene expression. // J Biol Eng. 2011. T. 5. C. 12.
116. Leonard E., Yan Y., Koffas M.A. Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. Metab Eng. 2006. T. 8. №2. C. 172-181.
117. Li L., Zhao J., Zhao Y., Lu X., Zhou Z., Zhao C., Xu G. Comprehensive investigation of tobacco leaves during natural early senescence via multi-platform metabolomics analyses. // Sci Rep. 2016. T. 6. Cт. 37976.
118. Li M.H., Ung P.M., Zajkowski J., Garneau-Tsodikova S., Sherman D.H. Automated genome mining for natural products. // BMC Bioinformatics. 2009. T. 10. Cт. 185.
119. Lian J., Si T., Nair N.U., Zhao H. Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains. // Metab Eng. 2014. T. 24. C. 139-149.
120. Lin J.Q., Zhao X.X., Zhi Q.Q., Zhao M., He Z.M. Transcriptomic profiling of *Aspergillus flavus* in response to 5-azacytidine. // Fungal Genet Biol. 2013. T. 56. C. 78-86.
121. Liu D., Xiao Y., Evans B.S., Zhang F. Negative feedback regulation of fatty acid production based on a malonyl-CoA sensor-actuator. // ACS Synth Biol. 2015. T. 4. №2. C. 132-140.
122. Liu H., Jiang H., Haltli B., Kulowski K., Muszynska E., Feng X., Summers M., Young M., Graziani E., Koehn F., Carter G.T., He M. Rapid cloning and heterologous expression of the meridamycin biosynthetic gene cluster using a versatile *Escherichia coli*-*streptomyces* artificial chromosome vector, pSBAC. // J Nat Prod. 2009. T. 72. №3. C. 389-395.

123. Liu F., Vilaça P., Rocha I., Rocha M. Development and application of efficient pathway enumeration algorithms for metabolic engineering applications. // *Comput Methods Programs Biomed.* 2015. T.118. №2. C.134-146.
124. Lohr M., Schwender J., Polle J.E. Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: a spotlight on algae. // *Plant Sci.* 2012. T. 185-186. C. 9-22.
125. Looser V., Bruhlmann B., Bumbak F., Stenger C., Costa M., Camattari A., Fotiadis D., Kovar K. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. // *Biotechnol Adv.* 2015. T. 33. №6. Ч.2. C. 1177-1193.
126. Luo X., Reiter M.A., d'Espaux L., Wong J., Denby C.M., Lechner A., Zhang Y., Grzybowski A.T., Harth S., Lin W., Lee H., Yu C., Shin J., Deng K., Benites V.T., Wang G., Baidoo E.E.K., Chen Y., Dev I., Petzold C.J., Keasling J.D. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. // *Nature.* 2019. T. 567. №7746. C. 123-126.
127. Luo Y., Enghiad B., Zhao H. New tools for reconstruction and heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters. // *Nat Prod Rep.* 2016 T.33. №2. C. 174-182.
128. Luo Y., Li B.Z., Liu D., Zhang L., Chen Y., Jia B., Zeng B.X., Zhao H., Yuan Y.J. Engineered biosynthesis of natural products in heterologous hosts. // *Chem Soc Rev.* 2015. T. 44. №15. C. 5265-5290.
129. Lussier F.X., Colatrisano D., Wiltshire Z., Page J.E., Martin V.J. Engineering microbes for plant polyketide biosynthesis. // *Comput Struct Biotechnol J.* 2013 T. 3. e201210020.
130. Ma S.M., Li J.W., Choi J.W., Zhou H., Lee K.K., Moorthie V.A., Xie X., Kealey J.T., Da Silva N.A., Vederas J.C, Tang Y. Complete reconstitution of a highly reducing iterative polyketide synthase. // *Science.* 2009 T. 326. №5952. C. 589-592.
131. Madzak C. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015. T. 99. №11. C. 4559-4577.
132. Malla S., Koffas M.A., Kazlauskas R.J., Kim B.G. Production of 7-O-methyl aromadendrin, a medicinally valuable flavonoid, in *Escherichia coli*. // *Appl Environ Microbiol.* 2012. T. 78. №3. C. 684-694.
133. Malpartida F., Hopwood D.A. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. // *Nature.* 1984 T. 6. №309(5967). C.462-464.

134. Marsafari M., Xu P. Debottlenecking mevalonate pathway for antimalarial drug precursor amorpha-4,11-diene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng Commun.* 2020. T. 10. e00121.
135. Martin V.J., Pitera D.J., Withers S.T., Newman J.D., Keasling J.D. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. // *Nat Biotechnol.* 2003 T.21. №7. C. 796-802.
136. Martinez A., Kolvek S.J., Yip C.L., Hopke J., Brown K.A., MacNeil I.A., Osburne M.S. Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. // *Appl Environ Microbiol.* 2004. T. 70. №4. C. 2452-2463.
137. Mattozzi M.d., Ziesack M., Voges M.J., Silver P.A., Way J.C. Expression of the sub-pathways of the *Chloroflexus aurantiacus* 3-hydroxypropionate carbon fixation bicycle in *E. coli*: Toward horizontal transfer of autotrophic growth. // *Metab Eng.* 2013 T.16. C.130-139.
138. McShan D.C., Rao S., Shah I. PathMiner: predicting metabolic pathways by heuristic search. // *Bioinformatics.* 2003. T.19. №13. C.1692-1698.
139. Medema M.H., Blin K., Cimermancic P., de Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M.A., Weber T., Takano E., Breitling R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. // *Nucleic Acids Res.* 2011. T. 39. (Выпуск Web Server):W339-346.
140. Meighen E.A. Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the *lux* genes. // *FASEB J.* 1993. T. 7. №11. C. 1016-1022.
141. Miller J.C., Holmes M.C., Wang J., Guschin D.Y., Lee Y.L., Rupniewski I., Beausejour C.M., Waite A.J., Wang N.S., Kim K.A., Gregory P.D., Pabo C.O., Rebar E.J. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. // *Nat Biotechnol.* 2007. T. 25. №7. C. 778-85.
142. Miller K.G., Bhattacharjee J.K. The LYS5 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. // *Gene.* 1996. T. 172. №1. C. 167-168.
143. Milne N., Thomsen P., Mølgaard Knudsen N., Rubaszka P., Kristensen M., Borodina I. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the de novo production of psilocybin and related tryptamine derivatives. // *Metab Eng.* 2020. T. 60. C. 25-36.



144. Misawa N. Pathway engineering for functional isoprenoids. // *Curr Opin Biotechnol.* 2011. T. 22. №5. C. 627-633.
145. Montiel D., Kang H.S., Chang F.Y., Charlop-Powers Z., Brady S.F. Yeast homologous recombination-based promoter engineering for the activation of silent natural product biosynthetic gene clusters. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015. T. 112. №29. C. 8953-8958.
146. Moore S.J., Lai H.E., Kelwick R.J., Chee S.M., Bell D.J., Polizzi K.M., Freemont P.S. EcoFlex: A Multifunctional MoClo Kit for *E. coli* Synthetic Biology. // *ACS Synth Biol.* 2016. T. 5. №10. C. 1059-1069.
147. Moriya Y., Shigemizu D., Hattori M., Tokimatsu T., Kotera M., Goto S., Kanehisa M. PathPred: an enzyme-catalyzed metabolic pathway prediction server. // *Nucleic Acids Res.* 2010. (Выпуск Web Serve). W138-43.
148. Mortimer C.L., Dugdale B., Dale J.L. Updates in inducible transgene expression using viral vectors: from transient to stable expression. // *Curr Opin Biotechnol.* 2015. T. 32. C. 85-92.
149. Muntendam R., Melillo E., Ryden A., Kayser O. Perspectives and limits of engineering the isoprenoid metabolism in heterologous hosts. // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009. T. 84. №6. C. 1003-1019.
150. Nakagawa A., Matsumura E., Koyanagi T., Katayama T., Kawano N., Yoshimatsu K., Yamamoto K., Kumagai H., Sato F., Minami H. Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*. // *Nat. Commun.* 2016, T. 7, C. 10390.
151. Naqvi S., Zhu C., Farre G., Sandmann G., Capell T., Christou P. Synergistic metabolism in hybrid corn indicates bottlenecks in the carotenoid pathway and leads to the accumulation of extraordinary levels of the nutritionally important carotenoid zeaxanthin. // *Plant Biotechnol J.* 2011. T. 9. №3. C. 384-393.
152. NCBI Resource Coordinators. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. // *Nucleic Acids Res.* 2017. T. 45. D12-D17.
153. Neumann H., Wang K., Davis L., Garcia-Alai M., Chin J.W. Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome. // *Nature.* 2010. T. 464. №7287. C. 441-444.
154. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. // *J Nat Prod.* 2012. T. 75. №3. C. 311-335.

155. Nielsen M.T., Nielsen J.B., Anyaogu D.C., Holm D.K., Nielsen K.F., Larsen T.O., Mortensen U.H. Heterologous reconstitution of the intact geodin gene cluster in *Aspergillus nidulans* through a simple and versatile PCR based approach. // PLoS One. 2013. T. 8. №8. e72871.
156. Nowroozi F.F., Baidoo E.E., Ermakov S., Redding-Johanson A.M., Batth T.S., Petzold C.J., Keasling J.D. Metabolic pathway optimization using ribosome binding site variants and combinatorial gene assembly. // Appl Microbiol Biotechnol. 2014. T. 98. №4. C. 1567-1581.
157. Oikawa H. Reconstitution of biosynthetic machinery of fungal natural products in heterologous hosts. // Biosci Biotechnol Biochem. 2020. T. 84. №3. C. 433-444.
158. Oliveira A.G., Desjardin D.E., Perry B.A., Stevani C.V. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. // Photochem Photobiol Sci. 2012. T. 11. №5. C. 848-852.
159. Ongley S.E., Bian X., Neilan B.A., Müller R. Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways. // Nat Prod Rep. 2013. T.30. №8. C.1121-38.
160. Orth J.D., Thiele I., Palsson B.Ø. What is flux balance analysis? // Nat Biotechnol. 2010. T.28. №3. C.245-248.
161. Otto M., Teixeira P.G., Vizcaino M.I., David F., Siewers V. Integration of a multi-step heterologous pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for the production of abscisic acid. // Microb Cell Fact. 2019. T. 18. №1. C. 205.
162. Pearce S., Huttly A.K., Prosser I.M., Li Y.D., Vaughan S.P., Gallova B., Patil A., Coghill J.A., Dubcovsky J., Hedden P., Phillips A.L. Heterologous expression and transcript analysis of gibberellin biosynthetic genes of grasses reveals novel functionality in the GA3ox family. // BMC Plant Biol. 2015. T. 15. C. 130.
163. Peña D.A., Gasser B., Zanghellini J., Steiger M.G., Mattanovich D. Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. // Metab Eng. 2018. T. 50. C. 2-15.
164. Pfeifer B.A., Admiraal S.J., Gramajo H., Cane D.E., Khosla C. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. // Science. 2001 T. 291. №5509. C.1790-1792.
165. Pittard J., Camakaris H., Yang J. The TyrR regulon. // Mol Microbiol. 2005. T. 55. №1. C. 16-26.

166. Pritchard J., Clegg J.B., Weatherall D.J., Longley J. Proceedings: The translation of human globin messenger RNA in heterologous assay systems. // *Br J Haematol.* 1974. T. 28. №1. C.141-142.
167. Pu K. Biosensors and Bioimaging. // *Chembiochem.* 2019. T. 20. №4. C. 420-421.
168. Purtov K.V., Petushkov V.N., Baranov M.S., Mineev K.S., Rodionova N.S., Kaskova Z.M., Tsarkova A.S., Petunin A.I., Bondar V.S., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E., Oba Y., Oba Y., Arseniev A.S., Lukyanov S., Gitelson J.I., Yampolsky I.V. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. // *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015. T. 54. №28. C. 8124-8128.
169. Qi X., Zha J., Liu G.G., Zhang W., Li B.Z., Yuan Y.J. Heterologous xylose isomerase pathway and evolutionary engineering improve xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Front Microbiol.* 2015. T.6. Cт. 1165.
170. Quadri L.E., Weinreb P.H., Lei M., Nakano M.M., Zuber P., Walsh C.T. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. // *Biochemistry.* 1998. T. 37. №6. C. 1585-1595.
171. Quin M.B., Schmidt-Dannert C. Designer microbes for biosynthesis. // *Curr Opin Biotechnol.* 2014 T. 29. C. 55-61.
172. Ramos K.R., Valdehuesa K.N., Liu H., Nisola G.M., Lee W.K., Chung W.J. Combining De Ley-Doudoroff and methylerythritol phosphate pathways for enhanced isoprene biosynthesis from D-galactose. // *Bioprocess Biosyst Eng.* 2014. T. 37. №12. C. 2505-2513.
173. Rausch C., Hoof I., Weber T., Wohlleben W., Huson D.H. Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. // *BMC Evol Biol.* 2007. T. 7. Cт. 78.
174. Reid R., Piagentini M., Rodriguez E., Ashley G., Viswanathan N., Carney J., Santi D.V., Hutchinson C.R., McDaniel R. A model of structure and catalysis for ketoreductase domains in modular polyketide synthases. // *Biochemistry.* 2003. T. 42. №1. C. 72-79.
175. Reyes L.H., Kao K.C. Growth-Coupled Carotenoids Production Using Adaptive Laboratory Evolution. // *Methods Mol Biol.* 2018. T. 1671. C. 319-330.
176. Rodrigues J.L., Prather K.L., Kluskens L.D., Rodrigues L.R. Heterologous production of curcuminoids. // *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015. T. 79. №1. C. 39-60.

177. Rodriguez E., Menzella H.G., Gramajo H. Heterologous production of polyketides in bacteria. // *Methods Enzymol.* 2009. T. 459. C. 339-365.
178. Rugbjerg P., Naesby M., Mortensen U.H., Frandsen R.J. Reconstruction of the biosynthetic pathway for the core fungal polyketide scaffold rubrofusarin in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Microb Cell Fact.* 2013. T. 12. Cт. 31.
179. Ryan K.L., Moore C.T., Panaccione D.G. Partial reconstruction of the ergot alkaloid pathway by heterologous gene expression in *Aspergillus nidulans*. // *Toxins (Basel).* 2013. T. 5. №2. C. 445-455.
180. Sakai K., Kinoshita H., Shimizu T., Nihira T. Construction of a citrinin gene cluster expression system in heterologous *Aspergillus oryzae*. // *J Biosci Bioeng.* 2008. T. 106. №5. C. 466-472.
181. Santos C.N., Koffas M., Stephanopoulos G. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. // *Metab Eng.* 2011. T.13. №4. C.392-400.
182. Santos C.N., Xiao W., Stephanopoulos G. Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in *Escherichia coli*. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 T. 109. №34. C.13538-13543.
183. Savakis P.E., Angermayr S.A., Hellingwerf K.J. Synthesis of 2,3-butanediol by *Synechocystis* sp. PCC6803 via heterologous expression of a catabolic pathway from lactic acid- and enterobacteria. // *Metab Eng.* 2013. T. 20. C. 21-30.
184. Schimming O., Schmitt I., Bode H.B. Identification of the Sfp-Type PPTase EppA from the Lichenized Fungus *Evernia prunastri*. // *PLoS One.* 2016. T. 11. №1. e0145624.
185. Schmidt-Dannert C. Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. // *Curr Opin Chem Biol.* 2016. T. 31. C. 40-49.
186. Schobert R., Knauer S., Seibt S., Biersack B. Anticancer active illudins: recent developments of a potent alkylating compound class. // *Curr Med Chem.* 2011. T. 18. №6. C. 790-807.
187. Schreiber C., Müller H., Birrenbach O., Klein M., Heerd D., Weidner T., Salzig D., Czermak P. A high-throughput expression screening platform to optimize the production of antimicrobial peptides. // *Microb Cell Fact.* 2017. T. 16. №1. C29.
188. Sha C., Yu X.W., Zhang M., Xu Y. Efficient secretion of lipase r27RCL in *Pichia pastoris* by enhancing the disulfide bond formation pathway in the

- endoplasmic reticulum. // *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2013. T. 40. №11. C. 1241-1249.
189. Shao Z., Luo Y., Zhao H. Rapid characterization and engineering of natural product biosynthetic pathways via DNA assembler. // *Mol Biosyst*. 2011. T. 7. №4. C. 1056-1059.
190. Shao Z., Rao G., Li C., Abil Z., Luo Y., Zhao H. Refactoring the silent spectinabilin gene cluster using a plug-and-play scaffold. // *ACS Synth Biol*. 2013. T. 2. №11. C. 662-669.
191. Sharma S.S., Blattner F.R., Harcum S.W. Recombinant protein production in an *Escherichia coli* reduced genome strain. // *Metab Eng*. 2007. T. 9. №2. C. 133-141.
192. Si T., Luo Y., Bao Z., Zhao H. RNAi-assisted genome evolution in *Saccharomyces cerevisiae* for complex phenotype engineering. // *ACS Synth Biol*. 2015. T. 4. №3. C. 283-291.
193. Siddiqui M.S., Thodey K., Trenchard I., Smolke C.D. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. // *FEMS Yeast Res*. 2012. T. 12. №2. C.144-170.
194. Siegl T., Tokovenko B., Myronovskyi M., Luzhetskyy A. Design, construction and characterisation of a synthetic promoter library for fine-tuned gene expression in actinomycetes. // *Metab Eng*. 2013. T. 19. C. 98-106.
195. Siervo N., Battey J.N., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L., Willig A., Goepfert S., Peitsch M.C., Ivanov N.V. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. // *Nat Commun*. 2014. T. 5. Ct. 3833.
196. Silva-Rocha R., Martínez-García E., Calles B., Chavarría M., Arce-Rodríguez A., de Las Heras A., Páez-Espino A.D., Durante-Rodríguez G., Kim J., Nikel P.I., Platero R., de Lorenzo V. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. // *Nucleic Acids Res*. 2013. T. 41(выпуск Database). D666-75.
197. Solomon K.V., Moon T.S., Ma B., Sanders T.M., Prather K.L. Tuning primary metabolism for heterologous pathway productivity. // *ACS Synth Biol*. 2013. T. 2. №3. C. 126-135.
198. Song A.A., Abdullah J.O., Abdullah M.P., Shafee N., Othman R., Noor N.M., Rahim R.A. Engineering the lactococcal mevalonate pathway for increased sesquiterpene production. // *FEMS Microbiol Lett*. 2014. T. 355. №2. C.177-184.

199. Sosio M., Giusino F., Cappellano C., Bossi E., Puglia A.M., Donadio S. Artificial chromosomes for antibiotic-producing actinomycetes. // *Nat Biotechnol.* 2000. T. 18. №3. C. 343-345.
200. Specht E.A., Braselmann E., Palmer A.E. A Critical and Comparative Review of Fluorescent Tools for Live-Cell Imaging. // *Annu Rev Physiol.* 2017. T. 79. C. 93-117.
201. Starcevic A., Zucko J., Simunkovic J., Long P.F., Cullum J., Hranueli D. ClustScan: an integrated program package for the semi-automatic annotation of modular biosynthetic gene clusters and in silico prediction of novel chemical structures. // *Nucleic Acids Res.* 2008. T. 36. №21. C. 6882-6892.
202. Stevens D.C., Conway K.R., Pearce N., Villegas-Peñaranda L.R., Garza A.G., Boddy C.N. Alternative sigma factor over-expression enables heterologous expression of a type II polyketide biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. // *PLoS One.* 2013. T. 8. №5. e64858.
203. Stevens D.C., Hari T.P., Boddy C.N. The role of transcription in heterologous expression of polyketides in bacterial hosts. // *Nat Prod Rep.* 2013b T. 30. №11. C.1391-1411.
204. Stevens D.C., Henry M.R., Murphy K.A., Boddy C.N. Heterologous expression of the oxytetracycline biosynthetic pathway in *Myxococcus xanthus*. // *Appl Environ Microbiol.* 2010. T. 76. № 8. C. 2681-2683.
205. St-Pierre F., Cui L., Priest D.G., Endy D., Dodd I.B., Shearwin K.E. One-step cloning and chromosomal integration of DNA. // *ACS Synth Biol.* 2013. T. 2. №9. C. 537-541.
206. Strobel T., Al-Dilaimi A., Blom J., Gessner A., Kalinowski J., Luzhetska M., Pühler A., Szczepanowski R., Bechthold A., Rückert C. Complete genome sequence of *Saccharothrix espanaensis* DSM 44229(T) and comparison to the other completely sequenced Pseudonocardiaceae. // *BMC Genomics.* 2012. T. 13. C. 465.
207. Tagami K., Liu C., Minami A., Noike M., Isaka T., Fueki S., Shichijo Y., Toshima H., Gomi K., Dairi T., Oikawa H. Reconstitution of biosynthetic machinery for indole-diterpene paxilline in *Aspergillus oryzae*. // *J Am Chem Soc.* 2013. T. 135. №4. C. 1260-1263.
208. Tatusov R.L., Fedorova N.D., Jackson J.D., Jacobs A.R., Kiryutin B., Koonin E.V., Krylov D.M., Mazumder R., Mekhedov S.L., Nikolskaya A.N., Rao B.S., Smirnov S., Sverdlov A.V., Vasudevan S., Wolf Y.I., Yin J.J., Natale D.A. The COG

- database: an updated version includes eukaryotes. // BMC Bioinformatics. 2003. T.4. C.41.
209. Thodey K., Galanie S., Smolke C.D. A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opioids. // Nat Chem Biol. 2014. T. 10. №10. C. 837-844.
210. Thyagarajan B., Olivares E.C., Hollis R.P., Ginsburg D.S., Calos M.P. Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. // Mol Cell Biol. 2001. T. 21. №12. C. 3926-3934.
211. Trantas E., Panopoulos N., Ververidis F. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. // Metab Eng. 2009. T.11. №6. C.355-366.
212. Tsunematsu Y., Ishiuchi K., Hotta K., Watanabe K. Yeast-based genome mining, production and mechanistic studies of the biosynthesis of fungal polyketide and peptide natural products. // Nat Prod Rep. 2013. T. 30. №8. C. 1139-1149.
213. Tyo K.E., Ajikumar P.K., Stephanopoulos G. Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. // Nat Biotechnol. 2009. T. 27. №8. C. 760-765.
214. Velmurugan R., Incharoensakdi A. Heterologous Expression of Ethanol Synthesis Pathway in Glycogen Deficient *Synechococcus elongatus* PCC 7942 Resulted in Enhanced Production of Ethanol and Exopolysaccharides. // Front Plant Sci. 2020. T. 11. Cт. 74.
215. Vijayakumar S., Conway M., Lió P., Angione C. Optimization of Multi-Omic Genome-Scale Models: Methodologies, Hands-on Tutorial, and Perspectives. // Methods Mol Biol. 2018. T.1716. C.389-408.
216. Vivien E., Pitorre D., Cociancich S., Pieretti I., Gabriel D.W., Rott P.C., Royer M. Heterologous production of albicidin: a promising approach to overproducing and characterizing this potent inhibitor of DNA gyrase. // Antimicrob Agents Chemother. 2007. T. 51. №4. C. 1549-1552.
217. Vogl T., Ahmad M., Krainer F.W., Schwab H., Glieder A. Restriction site free cloning (RSFC) plasmid family for seamless, sequence independent cloning in *Pichia pastoris*. // Microb Cell Fact. 2015. T. 14. C. 103.
218. Vogl T., Glieder A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. // N Biotechnol. 2013. T. 30. №4. C. 385-404.

219. Vogl T., Sturmberger L., Kickenweiz T., Wasmayer R., Schmid C., Hatzl A.M., Gerstmann M.A., Pitzer J., Wagner M., Thallinger G.G., Geier M., Glieder A. A Toolbox of Diverse Promoters Related to Methanol Utilization: Functionally Verified Parts for Heterologous Pathway Expression in *Pichia pastoris*. // ACS Synth Biol. 2016. T. 5. №2.C. 172-186.
220. Voit E., Torres N. V. Pathways Analysis and Optimization in Metabolic Engineering. // Cambridge:University Press. 2002., ctp. X
221. Wang H.H., Isaacs F.J., Carr P.A., Sun Z.Z., Xu G., Forest C.R., Church G.M. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. // Nature. 2009. T. 460. №7257. C. 894-898.
222. Wang M., Beissner M., Zhao H. Aryl-aldehyde formation in fungal polyketides: discovery and characterization of a distinct biosynthetic mechanism. // Chem Biol. 2014. T. 21. №2. C. 257-263.
223. Wang Y., Pfeifer B.A. 6-deoxyerythronolide B production through chromosomal localization of the deoxyerythronolide B synthase genes in *E. coli*. // Metab Eng. 2008. T. 10. №1. C. 33-38.
224. Watanabe K., Oguri H., Oikawa H. Diversification of echinomycin molecular structure by way of chemoenzymatic synthesis and heterologous expression of the engineered echinomycin biosynthetic pathway. // Curr Opin Chem Biol. 2009 T.13. №2. C.189-196.
225. Watson J.F., García-Nafría J. In vivo DNA assembly using common laboratory bacteria: A re-emerging tool to simplify molecular cloning. // J Biol Chem. 2019. T. 294. №42. C. 15271-15281.
226. Wawrzyn G.T., Quin M.B., Choudhary S., López-Gallego F., Schmidt-Dannert C. Draft genome of *Omphalotus olearius* provides a predictive framework for sesquiterpenoid natural product biosynthesis in Basidiomycota. // Chem Biol. 2012. T. 19. №6. C. 772-783.
227. Weaver L.J., Sousa M.M., Wang G., Baidoo E., Petzold C.J., Keasling J.D. A kinetic-based approach to understanding heterologous mevalonate pathway function in *E. coli*. // Biotechnol Bioeng. 2015. T. 112. №1. C. 111-119.
228. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. // PLoS One. 2011. T. 6. №2. e16765.



229. Weber T., Rausch C., Lopez P., Hoof I., Gaykova V., Huson D.H., Wohlleben W. CLUSEAN: a computer-based framework for the automated analysis of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. // J Biotechnol. 2009. T. 140. №№1-2. C. 13-17.
230. Wenzel S.C., Gross F., Zhang Y., Fu J., Stewart A.F., Müller R. Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in pseudomonads via red/ET recombineering. // Chem Biol. 2005. T. 12. № 3. C. 349-356.
231. Wenzel S.C., Müller R. Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. // Curr Opin Biotechnol. 2005. T. 16. №. 6. C. 594-606.
232. Wingler L.M., Cornish V.W. Reiterative Recombination for the in vivo assembly of libraries of multigene pathways. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2011. T. 108. №37. C. 15135-15140.
233. Winkler J., Reyes L.H., Kao K.C. Adaptive laboratory evolution for strain engineering. // Methods Mol Biol. 2013. T. 985. C. 211-22.
234. Woodhouse J.N., Fan L., Brown M.V., Thomas T., Neilan B.A. Deep sequencing of non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthases from the microbiomes of Australian marine sponges. // ISME J. 2013. T. 7. №9. C. 1842-1851.
235. Wong T.Y., Yao X.T. The DeLey-Doudoroff Pathway of Galactose Metabolism in *Azotobacter vinelandii*. // Appl Environ Microbiol. 1994. T. 60. №6. C. 2065-2068.
236. Wu J., Zhou T., Du G., Zhou J., Chen J. Modular optimization of heterologous pathways for de novo synthesis of (2S)-naringenin in *Escherichia coli*. // PLoS One. 2014. T. 9. №7. e101492.
237. Yaegashi J., Oakley B.R., Wang C.C. Recent advances in genome mining of secondary metabolite biosynthetic gene clusters and the development of heterologous expression systems in *Aspergillus nidulans*. // J Ind Microbiol Biotechnol. 2014. T. 41. №2. C. 33-42.
238. Yamada Y., Matsuda M., Maeda K., Mikata K. The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (Saccharomycetaceae). // Biosci Biotechnol Biochem. 1995. T.59. №3. 439-444.

239. Yang J., Xie X., Xiang N., Tian Z.X., Dixon R., Wang Y.P. Polyprotein strategy for stoichiometric assembly of nitrogen fixation components for synthetic biology. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2018. T. 115. №36. E8509-E8517.
240. Yang Y., Lin Y., Li L., Linhardt R.J., Yan Y. Regulating malonyl-CoA metabolism via synthetic antisense RNAs for enhanced biosynthesis of natural products. // Metab Eng. 2015 T. 29. C. 217-226.
241. Yang Z., Zhang Z. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. // Biotechnol Adv. 2018a. T.36. №1. C.182-195.
242. Yang Z., Zhang Z. Production of (2R, 3R)-2,3-butanediol using engineered *Pichia pastoris*: strain construction, characterization and fermentation. // Biotechnol Biofuels. 2018b. T. 11. Cт. 35.
243. Yap H.Y., Muria-Gonzalez M.J., Kong B.H., Stubbs K.A., Tan C.S., Ng S.T., Tan N.H., Solomon P.S., Fung S.Y., Chooi Y.H. Heterologous expression of cytotoxic sesquiterpenoids from the medicinal mushroom *Lignosus rhinocerotis* in yeast. // Microb Cell Fact. 2017. T. 16. №1. Cт. 103.
244. Ye R., Huang M., Lu H., Qian J., Lin W., Chu J., Zhuang Y., Zhang S. Comprehensive reconstruction and evaluation of *Pichia pastoris* genome-scale metabolic model that accounts for 1243 ORFs. // Bioresour Bioprocess. 2017. T.4. №1. C.22.
245. Yuan Y., Du J., Zhao H. Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering. // Methods Mol Biol. 2013. T. 985. C. 177-209.
246. Zahrl R.J., Peña D.A., Mattanovich D., Gasser B. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. // FEMS Yeast Res. 2017. T17. №7.
247. Zhang H., Boghigian B.A., Armando J., Pfeifer B.A. Methods and options for the heterologous production of complex natural products. // Nat Prod Rep. 2011. T.28. №1. C.125-51.
248. Zhao L., Chang W.C., Xiao Y., Liu H.W., Liu P. Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. // Annu Rev Biochem. 2013. T. 82. C. 497-530.
249. Zhou M., Jing X., Xie P., Chen W., Wang T., Xia H., Qin Z. Sequential deletion of all the polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic gene clusters and a 900-kb subtelomeric sequence of the linear

- chromosome of *Streptomyces coelicolor*. // FEMS Microbiol Lett. 2012. T. 333. №2. C.169-179.
250. Zhou K., Qiao K., Edgar S., Stephanopoulos G. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. // Nat Biotechnol. 2015. T. 33. №4. C. 377-383.
251. Zhu T., Guo M., Zhuang Y., Chu J., Zhang S. Understanding the effect of foreign gene dosage on the physiology of *Pichia pastoris* by transcriptional analysis of key genes. // Appl Microbiol Biotechnol. 2011. T. 89. №4. C. 1127-1135.
252. Ziemert N., Podell S., Penn K., Badger J.H., Allen E., Jensen P.R. The natural product domain seeker NaPDoS: a phylogeny based bioinformatic tool to classify secondary metabolite gene diversity. // PLoS One. 2012. T. 7. №3. e34064.