

На правах рукописи

Палкина Ксения Андреевна

**Ферменты биосинтеза поликетидов гиспидина
из кофейной кислоты**

Специальность 1.5.3 Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в лаборатории химии метаболических путей Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Мишин Александр Сергеевич, кандидат биологических наук.

Официальные оппоненты:

Муронец Владимир Израилевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биохимии животной клетки НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова».

Грядунов Дмитрий Александрович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией технологий молекулярной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Защита состоится «21» мая 2025 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном Научном Центре Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ИБХ РАН и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
В.А. Олейников**



Характеристика работы

Актуальность темы исследования

Гиспидин как метаболит растений и грибов был описан достаточно давно, однако о ферментах, которые участвуют в его синтезе, известно крайне мало. В грибах недавно описаны несколько гиспидинсинтаз, участвующих в процессе биолюминесценции и производящие гиспидин как предшественник люциферина грибов (Kotlobay и др. 2018; Shakhova и др. 2024). В растениях описаны поликетидсинтазы (ПКС) III типа из перца, производящие гиспидин (Pluskal и др. 2019) и другие α -пироны, схожие по структуре (Bisht и др. 2021). В данной работе исследуется насколько широко разнообразие таких ферментов, в каких организмах они могут встретиться, с какими субстратами могут взаимодействовать и какие продукты могут производить.

Биолюминесценция независимо возникла в разных группах живых организмов, эволюционно не связанных между собой, и ее биологическая роль до сих пор не установлена. Расшифровка механизма биолюминесценции грибов на примере *Neonothopanus nambi* позволила не только получить репортер для исследователей, но и открыла возможность манипуляций с отдельными этапами этого каскада для изучения и оптимизации. Так в данной работе впервые изучается возможность создания гибридного биолюминесцентного пути с использованием ферментов биосинтеза гиспидина из несветящихся организмов. Для дальнейшего эффективного использования этой системы необходимо исследовать ее функционирование в различных гетерологических хозяевах, определить и оптимизировать ключевые этапы биолюминесцентного каскада, в том числе размер доставляемой генетической конструкции и провести сравнение с описанными люциферин-люциферазными реакциями, что и было проделано в данном проекте.

Изучение биосинтеза гиспидина неотрывно связано с исследованием ПКС – основных ферментов, производящих его. ПКС изучаются более полувека, и их использование для производства биологически активных соединений имеет важное значение в промышленности, сельском хозяйстве и фармакологии. Несмотря на это, отсутствие необходимых знаний затрудняет рациональное планирование биосинтеза и увеличение продукции целевых соединений. Оптимизация продукции гиспидина позволит не только расширить наше представление о ПКС грибов и растений, но и в дальнейшем подробнее изучить свойства этого поликетиды, ценные для медицины и биотехнологии (Lee and Yun 2011).

Степень разработанности области исследования

Недавно в нашей лаборатории была расшифрована биолюминесцентная система грибов, которая положила основу изучения ее как репортера и разработке новых инструментов визуализации на ее основе различными научными коллективами по всему миру. В 2012 году продемонстрировано, что перекрестные реакции горячих и холодных экстрактов мицелия разных люминесцентных грибов совместимы друг с другом (Oliveira и др. 2012). Вскоре был описан люциферин грибов – 3-гидроксигиспидин и его предшественник – гиспидин (Purtov и др. 2015). В 2018 году была расшифрована биолюминесценция гриба *Neonothopanus nambi*: гиспидинсинтаза (nnHisps) превращает кофейную кислоту в гиспидин, который преобразуется в люциферин с помощью гиспидин-3-гидроксилазы (H3H), далее окисляется люциферазой (Luz) с испусканием света до оксилуциферина, который снова превращается в кофейную кислоту с помощью кафеоилпируватгидролазы (CPH), замыкая цикл (Kotlobay и др. 2018). В этой же работе была показана принципиальная возможность применения биолюминесцентной системы в гетерологических хозяевах.

В 2020 впервые созданы автономно светящихся растения и клетки млекопитающих с этой биолюминесцентной системой (Mitiouchkina и др. 2020; Khakhar и др. 2020). В 2024 биолюминесцентная система на основе ферментов из *N. nambi* была усовершенствована: подобрана гиспидинсинтаза из *Muscena citricolor* и показано важное значение дополнительного фермента, осуществляющего ее фосфопантетеинилирование (Shakhova и др. 2024). Увеличения яркости биолюминесценции в растениях удалось добиться с помощью гетерологической экспрессии генов ферментов, вовлеченных метаболизм кофейной кислоты (Zheng и др. 2023), а также подавляя конкурирующие со свечением метаболические пути (Jieyu Ge и др. 2024). Также развиваются применения данной биолюминесцентной системы в качестве репортера *Nicotiana benthamiana* (Calvache и др. 2024).

Цель и задачи работы

Цель работы: поиск и изучение ферментов биосинтеза гиспидина из небиолюминесцентных организмов (грибов и растений) для создания на их основе гибридной биолюминесцентной системы в гетерологических хозяевах.

Задачи работы:

1. Исследовать активность ранее предсказанных ПКС небиолюминесцентных грибов cgPKS, hsPKS, gcPKS в клетках дрожжей с использованием ВЭЖХ-МС/МС, различных субстратов, и направленного мутагенеза;
2. Идентифицировать вероятные ферменты биосинтеза гиспидина в растениях на основе анализа литературы и биоинформатическими методами;

3. Протестировать функциональную активность отобранных ферментов в различных гетерологических системах – клетках растений, дрожжей и культуре клеток млекопитающих;
4. Создать автономные биолюминесцентные стабильные линии *N. benthamiana*, экспрессирующие ген отобранной ПКС из растений, а также гены ферментов биолюминесцентной системы грибов;
5. Подтвердить биосинтез гиспидина отобранными ПКС с помощью ВЭЖХ-МС/МС в гетерологических системах;

Научная новизна и практическая ценность работы

В представленной работе впервые создана гибридная биолюминесцентная система, состоящая из ферментов *N. nambi* (Kotlobay и др. 2018; Mitouchkina и др. 2020), а также ферментов биосинтеза гиспидина из растений – ПКС и 4-кумароил-КоА-лигаз. Некоторые ферменты из растений, были описаны в исследованиях ранее, как синтезирующие α -пироны, а ферменты из хвоща были предсказаны в настоящей работе впервые. Данный гибридный каскад показал свою функциональность в гетерологических системах, таких как клетки дрожжей и млекопитающих, а также позволил создать автономно светящиеся клетки табака BY-2 и растение *Nicotiana benthamiana*. Гибридная биолюминесцентная система оказалась сравнима по уровню свечения с другими люциферин-люциферазными реакциями: люциферазы светлячка *Photinus pyralis* – FFLuc и искусственно оптимизированной люциферазы *Oplophorus gracilirostris* – NanoLuc, или даже превосходила реакцию окисления D-люциферина с участием FFLuc в клетках дрожжей.

Небольшой размер ПКС растений в сравнении с ферментами из грибов позволил добиться сокращения размера кодирующей генетической конструкции. Это сделало возможным ее доставку с помощью вирусных систем, что было продемонстрировано группой профессора Диего Орзаеса (Universitat Politècnica de València) (Palkina и др. 2024). Трансформация с помощью вирусов применяется в исследованиях растений и клеток млекопитающих, таким образом, это подчеркивает и практическую ценность полученных результатов.

Кроме того, впервые для широкого набора ПКС – от мхов до двудольных растений – подтверждена способность производить гиспидин из кофейной кислоты, что ранее было описано только для ферментов из перца (PmSPS1, PmSPS2).

В данной работе впервые продемонстрировано функционирование биолюминесцентной системы не только с кофейной кислотой, но и с кумаровой и феруловой кислотами – распространенными метаболитами растений. Промежуточные продукты каждого этапа такого превращения еще предстоит исследовать, однако, согласно полученным данным, спектр свечения систем с

кофейной и кумаровой кислотами отличается. Это демонстрирует на практике толерантность к субстрату не только ПКС, но других ферментов биолюминесцентной системы (Kaskova и др. 2017; Purto и др. 2015), и в дальнейшем открывает возможность разработки многоцветной автономной биолюминесценции.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 146 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, описания полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 253 ссылки, 39 рисунков, 2 таблицы в основном тексте и 6 в приложении.

Степень достоверности результатов

Достоверность и воспроизводимость полученных результатов обеспечена современными методами исследований, налаженными в нашей лаборатории, публикациями в рецензируемых научных журналах, независимой верификацией другими научными группами, приведенными материалами и статистической обработкой полученных данных.

Апробация работы и публикации

Материалы данной работы были опубликованы в 3 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России к опубликованию результатов диссертаций, а также представлены в виде устных докладов на всероссийских конференциях: XXXI и XXXII Зимняя молодежная школа ИБХ РАН (Москва, Россия, 2019 г., 2020 г.), 44-й конгресс FEBS (Краков, Польша, 2019 г.). Постерные доклады были представлены на 43-м и 45-м конгрессах FEBS (Прага, Чехия, 2018 г.; онлайн, 2021 г.) и Европейском Биотехнологическом Конгрессе (Валенсия, Испания, 2019 г.; онлайн, 2020 г.).

Основное содержание работы

Поиск новых ферментов биосинтеза гиспицина среди ПКС небиолюминесцентных грибов

Появление биолюминесценции грибов порядка *Agaricales* связано с возникновением кластера генов ферментов биолюминесцентной системы, включающей в себя люциферазу (Luz), гиспидин-3-гидроксилазу (H3H), кафеоилпируватгидролазу (CPH) и гиспидинсинтазу (Hisps). Филогенетический анализ родственных биолюминесцентных и небиллюминесцентных грибов показал, что отсутствие способности производить свечение может быть связано с потерей генов данного кластера в ходе эволюции (Kotlobay и др. 2018; Ke и др. 2020). При этом поликетидсинтазы (ПКС) грибов, у которых свечение отсутствует, содержат дополнительные домены: кеторедуктазный и дегидратазный, помимо пяти других доменов, консервативных в кладе биолюминесцентных грибов. Поэтому мы

предположили, что такие особенности архитектуры ПКС важны в эволюционном отделении этой группы ферментов, и их специализации на биосинтезе гиспидина, предшественника люциферина грибов. Для проверки этой гипотезы были выбраны три ПКС неблюминесцентных грибов, в составе которых было семь доменов: *Cortinarius glaucopus* (cgPKS), *Hypholoma sublateritium* (hsPKS) и *Gymnopilus chrysopellus* (gcPKS). Границы доменов ПКС были предсказаны с помощью алгоритма HMMER, а также были созданы мутантные версии этих ПКС, С-концевые домены которых отсутствовали полностью ($\Delta 2$) или частично ($\Delta 2_C$).

Функционирование ПКС неблюминесцентных грибов в клетках *Pichia pastoris*, предполагалось оценивать по уровню свечения колоний при добавлении кофейной кислоты (рис.1 А). Для этого стабильные линии *P. pastoris* в дополнение к генам ПКС, экспрессировали гены ферментов билюминесцентной системы *N.nambi*: люциферазы (nnLuz), гиспидин-3-гидроксилазы (nnH3H), а также вспомогательного фермента, осуществляющего фосфопантетеинилирование из *Aspergillus nidulans* (NpgA), необходимого для работы ПКС грибов (Shakhova и др. 2024).

Мы наблюдали билюминесценцию в ответ на добавление кофейной кислоты к колониям *P. pastoris*, экспрессирующим полноразмерную версию hsPKS, что позволяет предположить продукцию гиспидина или близкого аналога (рис.1 Б). Однако интенсивность сигнала была ниже контрольной линии с nnHisps, что может свидетельствовать о том, что гиспидин или его аналог скорее всего является побочным продуктом. Однако крайне любопытно, что фермент из неблюминесцентного гриба, филогенетически отделившегося от клады билюминесцентных грибов еще в Юрском периоде (Ke и др. 2020), и не имеющего в геноме люциферазы и гиспидин-3-гидроксилазы, способен поддерживать билюминесценцию на заметном уровне. Для образцов с полноразмерными gcPKS и cgPKS, а также для укороченных версий cgPKS, hsPKS, gcPKS зарегистрировать билюминесцентный сигнал не удалось.

Мы провели ВЭЖХ-МС/МС анализ линий дрожжей, экспрессирующих cgPKS, hsPKS, gcPKS. В результате анализа выяснилось, что образцы с гиспидинсинтазой *N. nambi*, демонстрирующие свечение от кофейной кислоты, содержали гиспидин. При этом для образцов с hsPKS и cgPKS, gcPKS при добавлении кофейной кислоты гиспидина зарегистрировано не было (рис.1 В). В связи с тем, что штамм, экспрессирующий hsPKS, люминесцирует в присутствии кофейной кислоты, мы предполагаем, что этот фермент производит либо гиспидин в количествах, недостаточных для обнаружения методом ВЭЖХ-МС/МС, либо другие подобные производные кофейной кислоты, обладающие потенциальной люминесцентной активностью.

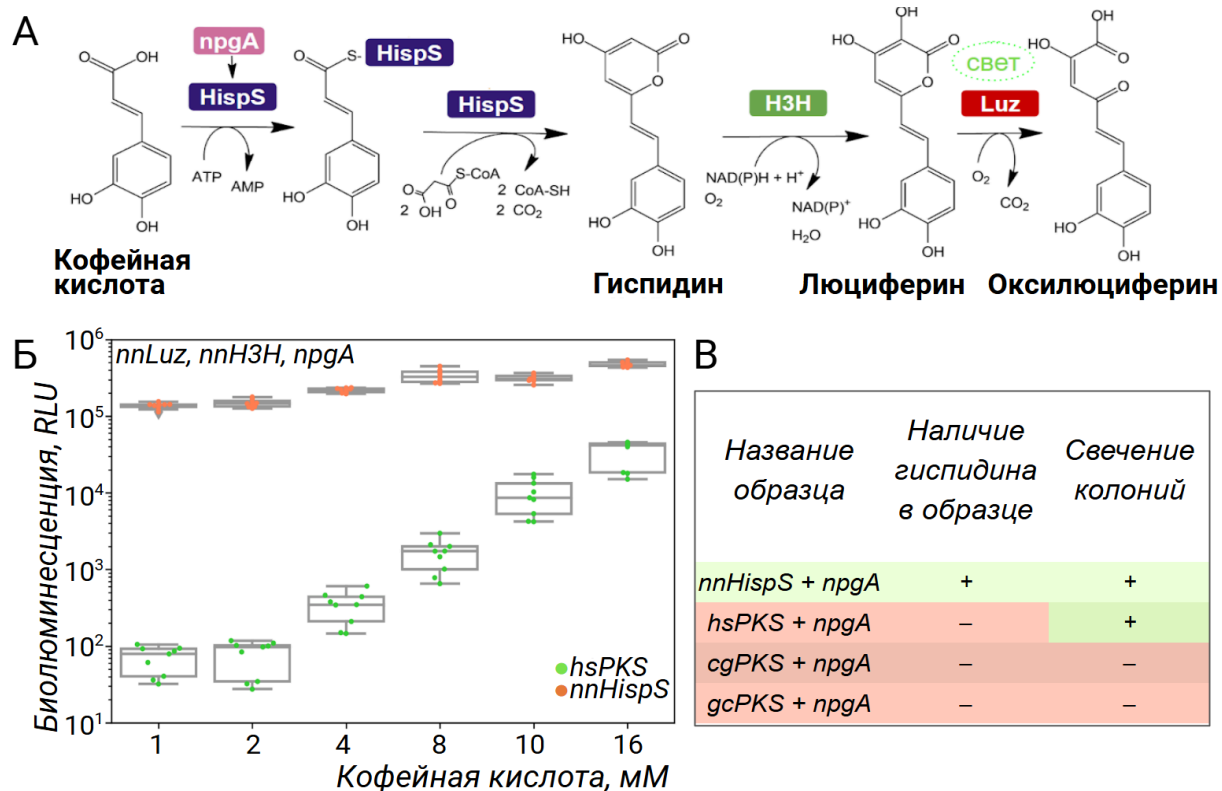


Рисунок 1. Анализ функционирования ПКС грибов в клетках *P. pastoris*. А) Схема реакции трансформации кофейной кислоты в гиспидин, люциферин и оксилюциферин у биолуминесцентных грибов. H3H – гиспидин-3-гидроксилаза, Luz – люцифераза, HispS – гиспидинсинтаза, NpgA – фосфопантетеин-трансфераза. Б) Люминесценция, излучаемая колониями, *P. pastoris*, экспрессирующими гены nnLuz, nnH3H, NpgA и hsPKS или nnHispS, после обработки раствором кофейной кислоты различных концентраций. В) Результаты ВЭЖХ-МС/МС анализа *P. pastoris*, экспрессирующих гены nnLuz, nnH3H, NpgA, nnHispS или cgPKS, или gcPKS, или hsPKS.

Взаимодействие ПКС грибов с аналогами кофейной кислоты

Существует предположение о том, что биолуминесцентная система грибов не ограничивается последовательной трансформацией кофейной кислоты в гиспидин, люциферин и оксилюциферин, а может использовать и другие субстраты для свечения. Так, в работе Константина Пуртова было продемонстрировано, что аналог гиспидина – биснорьянгонин, который мог бы быть синтезирован ПКС грибов из кумаровой кислоты, способен приводить к свечению (Purtov и др. 2015). Кроме того, работа Зинаиды Каськовой отмечает толерантность Luz *Neonothopanus gardneri* к используемому субстрату и изменение спектра биолуминесценции в зависимости от структуры аналога люциферина (Kaskova и др. 2017). Поэтому мы предположили, что низкая интенсивность свечения при добавлении кофейной кислоты связана с субстратной специфичностью ПКС, и протестировали другие гидроксикоричные кислоты, близкие по структуре к кофейной кислоте.

Оказалось, что дрожжи, экспрессирующие ген hsPKS, светились и при добавлении кумаровой и феруловой кислот (рис.2).

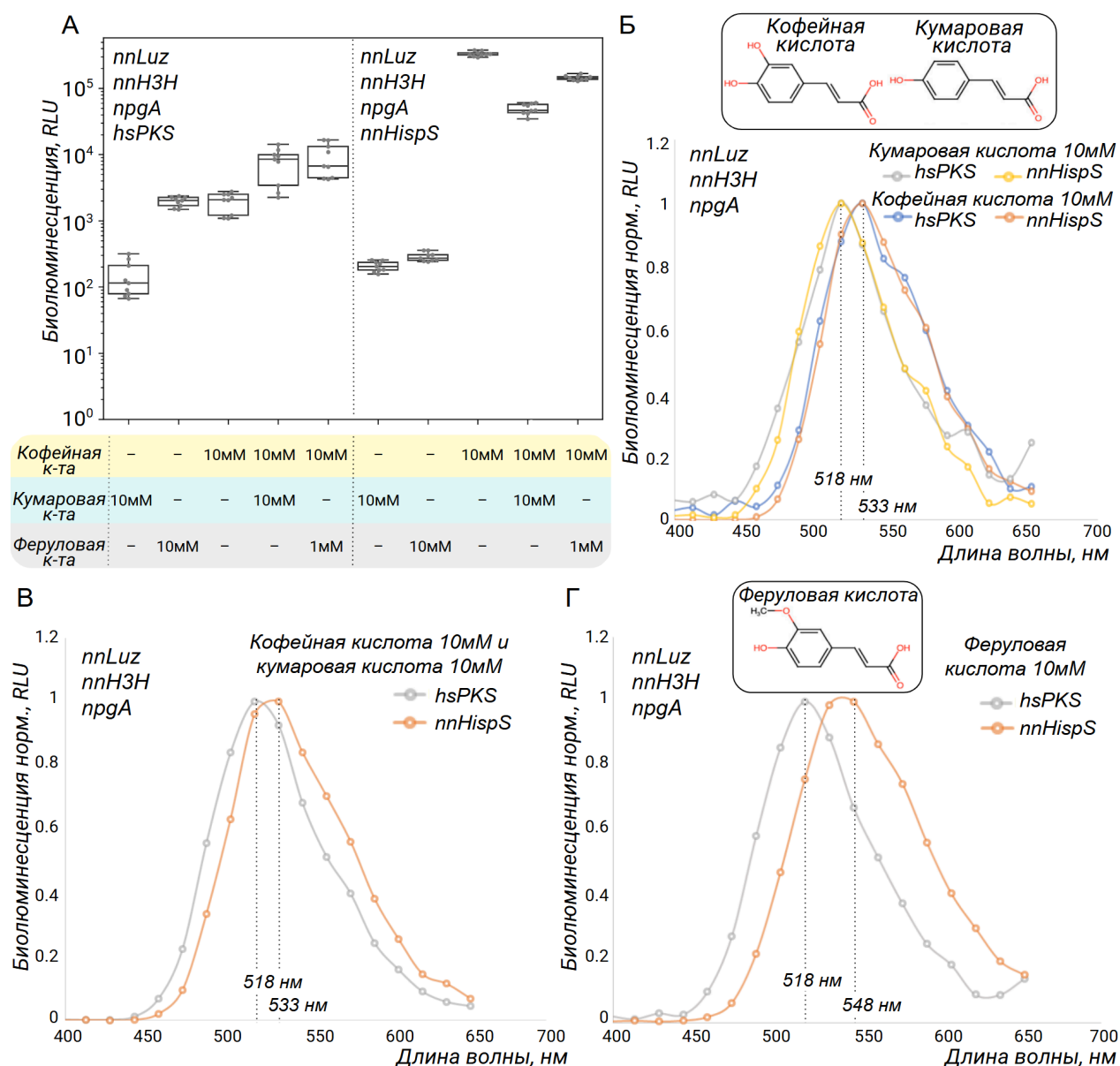


Рисунок 2. А) Люминесценция колоний *P. pastoris*, экспрессирующих гены nnLuz, nnH3H, NpgA и hsPKS или nnHispS, после обработки кумаровой, кофейной, феруловой кислотами или их эквимольной смесью. Спектры люминесценции, нормированные на максимальное значение, после обработки (Б) кофейной и кумаровой кислотами, (В) смесью кумаровой и кофейной кислот и (Г) только феруловой кислотой.

Спектр свечения биолуминесцентной системы грибов с nnHispS и hsPKS при добавлении кумаровой кислоты смещается в коротковолновую область относительно сигнала при добавлении кофейной кислоты (рис.2 Б). При этом, при добавлении эквимольной смеси кофейной и кумаровой кислот для hsPKS мы также наблюдаем смещение спектра относительно nnHispS, что, вероятно, отражает предпочтение hsPKS кумаровой кислоты в смеси, в отличие от nnHispS, предпочитающей кофейную кислоту (рис.2 В).

Любопытно, что добавление феруловой кислоты к дрожжам приводит к изменению спектров биолуминесценции для nnHispS и hsPKS, что заметно по положению максимума и может отражать различную структуру продуктов, производимых этими ПКС из одного субстрата (рис.2 Г). В тоже время,

биолюминесценция от феруловой кислоты свидетельствует и о широкой субстратной специфичности ферментов Luz и H3H *N. nambi*, способных утилизировать такие разные продукты ПКС.

Полученные данные согласуются с гипотезой о широком субстратном предпочтении ПКС и ферментов биолюминесцентной системы грибов. Мы показали способность hsPKS совместно с другими ферментами биолюминесцентной системы грибов приводить к свечению, однако подтвердить биосинтез гиспидина в штамме с hsPKS методом ВЭЖХ-МС/МС не удалось. Удаление кетосинтазного и дегидратазного доменов ПКС небиолюминесцентных грибов не увеличило биосинтез гиспидина на модели экспрессии ПКС в дрожжах, что свидетельствует о недостаточном понимании доменной организации ПКС и механизма катализируемой реакции.

Поиск новых ферментов биосинтеза гиспидина среди ПКС растений

При использовании биолюминесцентной системы грибов в качестве репортера существенным оказывается размер генетической конструкции, составляющий более 9 тысяч пар оснований только для кодирующих последовательностей генов ферментов, без учета регуляторных последовательностей. Гиспидинсинтаза грибов является наиболее крупным ферментом в этой системе – размер ее гена 5.1 кб. И при экспрессии в растениях размер гена nnHispS оказывается несовместим с системами доставки на основе РНК-вирусов, ограничение емкости которых до 4 кб (Chiong и др. 2021), или геминивирусов, для которых увеличение размера конструкции снижает эффективность репликации (Suárez-López и Gutiérrez 1997; Wang и др. 2017). Большой размер затрудняет доставку и аденоассоциированными вирусами для экспрессии в животных системах (Dong, Fan, и Frizzell 1996; Xu и др. 2019). Поэтому актуален поиск небольших по размеру ПКС, способных заменить nnHispS.

Среди компактных ПКС наиболее изучены ферменты III типа из растений. Они меньше, чем ПКС грибов (1.2 кб), и не требуют посттрансляционных модификаций. Известно, что ПКС III типа способны синтезировать стирилпироны, которые структурно близки к гиспидину, например, биснорьянгонин, а для ферментов из перца опьяняющего среди побочных продуктов реакции обнаружен и сам гиспидин. Поэтому мы проводили поиск гиспидинсинтаз среди этой группы ферментов и отобрали те, которые могут катализировать образование биснорьянгонина из кумароил-КоА, ожидая, что такие ферменты будут способны и к биосинтезу гиспидина из каффеоил-КоА. Кроме того, для хвоща, в котором обнаружено значительное количество гиспидина (Beckert и др. 1997), несколько вариантов генов ПКС были предсказаны по транскриптому по гомологии.

В отличие от ПКС I типа из грибов, субстратом ПКС III типа являются не свободные фенольные кислоты, а их КоА-производные, которые образуются в ходе реакции, катализируемой 4-кумароил-КоА-лигазой (4CL) (рис.3). Поэтому мы выбрали несколько генов 4CL, которые, по данным литературы, взаимодействовали с кофейной кислотой.

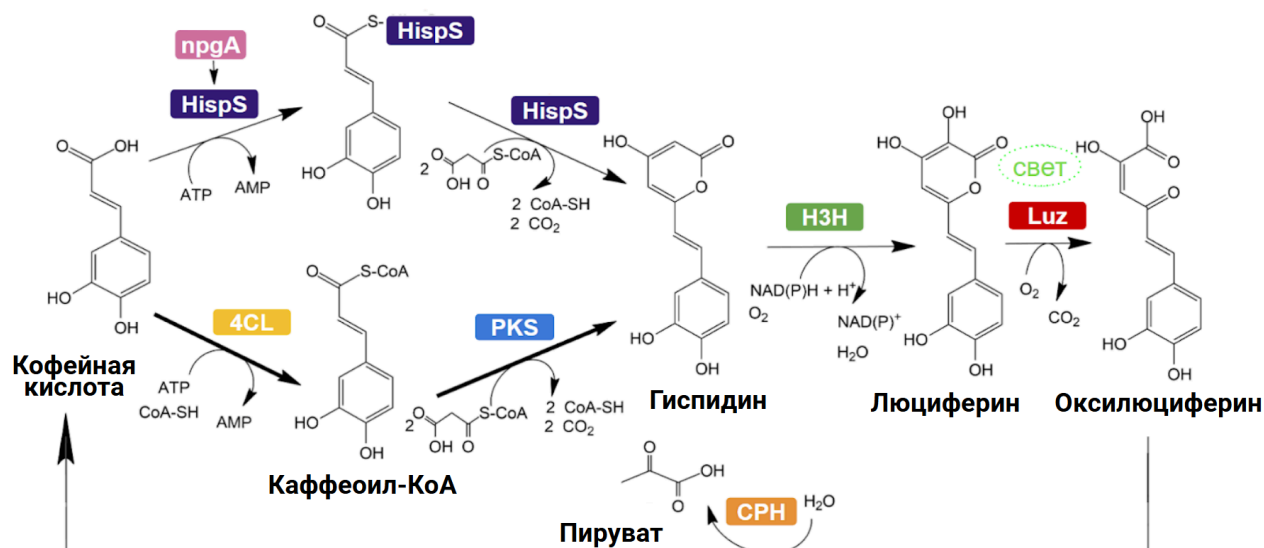


Рисунок 3. Схема реакции трансформации кофейной кислоты в гиспидин с помощью ферментов из грибов (HispS – гиспидинсинтазы) и растений (PKS – поликетидсинтазы III типа, 4CL – 4-кумароил-КоА-лигазы), а также его дальнейшее превращение в люциферин и оксиллюциферин, катализируемое ферментами из биоллюминесцентных грибов (H3H – гиспидин-3-гидроксилазой, Luz – люциферазой, CPN – кафеоилпируватгидролазой); NpgA – фосфопантетеин-трансфераза из *A. nidulans*.

Проверку 21 выбранной поликетидсинтазы растений в клетках дрожжей *P. pastoris* проводили совместно с 4CL (табл.1), а также генами ферментов биоллюминесцентной системы *N. nambi*: nnLuz и nnH3H. Мы измеряли биоллюминесценцию клеток при добавлении кофейной кислоты, предполагая ее последовательное превращение в гиспидин, а затем в люциферин грибов и оксиллюциферин (рис.3). В качестве контроля использовали линию, экспрессирующую вместо ферментов из растений, гиспидинсинтазу гриба *N. nambi* nnHispS и фосфопантетеин-трансферазу NpgA из *A. nidulans*.

Большее половины отобранных ПКС III типа растений показали свою функциональность в клетках дрожжей при добавлении кофейной кислоты, а 11 из них демонстрировали биоллюминесцентный сигнал даже выше контрольной линии. Наибольшую яркость показали поликетидсинтазы PzPKS2 и HmS из *Plumbago zeylanica* и *Hydrangea macrophylla* (рис.4 АБ). Комбинируя PzPKS2 с другими 4-кумароил-КоА-лигазами, мы обнаружили, что Pv4CL1 позволяет получить значительный прирост биоллюминесценции (рис.4 В).

Для подтверждения продукции гиспидина были созданы линии дрожжей экспрессирующих либо гены At4CL1 и ПКС, либо nnHispS и NpgA: в таких линиях мы ожидали накопление продуктов реакции. После добавления к колониям субстрата – кофейной кислоты – был проведен ВЭЖХ-МС/МС анализ экстрактов. Как и ожидалось, гиспидин был обнаружен во всех образцах с гиспидинсинтазами, приводившими к свечению в предыдущих экспериментах (рис.4 Г).

Таблица 1. Соответствие сокращенных названий PKS, 4CL и организма, из генома которого был выбран ген.

Организм, из генома которого выбран ген	Сокращение	Ссылка на исследование
PKS	<i>Aquilaria sinensis</i>	AsPKS1, AsPKS2 (Wang et al. 2017)
	<i>Hydrangea macrophylla</i>	HmS (Akiyama et al. 1999)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtPKSA (Colpitts et al. 2011)
	<i>Physcomitrella patens</i>	PpASCL
	<i>Polygonum cuspidatum</i>	PcPKS2, PcPKS3 (Ma et al. 2009) (Guo et al. 2013)
	<i>Rheum palmatum</i>	RpBAS_L132S (Shimokawa et al. 2010)
	<i>Rheum tataricum</i>	RtSTS (Samappito et al. 2003)
	<i>Wachendorfia thyrsiflora</i>	WtPKS1 (Brand et al. 2006)
	<i>Equisetum arvense</i>	EaPKS1, EaPKS3, EaPKS2, EaPKS3_mut (Beckert et al. 1997)
	<i>Piper methysticum</i>	PmSPS1, PmSPS2 (Pluskal et al. 2019)
	<i>Plumbago zeylanica</i>	PzPKS2 (Sakamoto et al. 2020)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	NtPKS1 (Lin et al. 2012)
	<i>Cassia alata</i>	CalPKS1 (Samappito et al. 2002)
	<i>Arachis hypogaea</i>	AhSTS (Morita et al. 2001)
	<i>Oryza sativa</i>	OsPKS (Morita et al. 2010)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4CL1, At4CL2 (Costa et al. 2005)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Nt4CL2 (Z. Li and Nair 2015)
	<i>Panicum virgatum</i>	Pv4CL1 (B. Xu et al. 2011)
4CL		

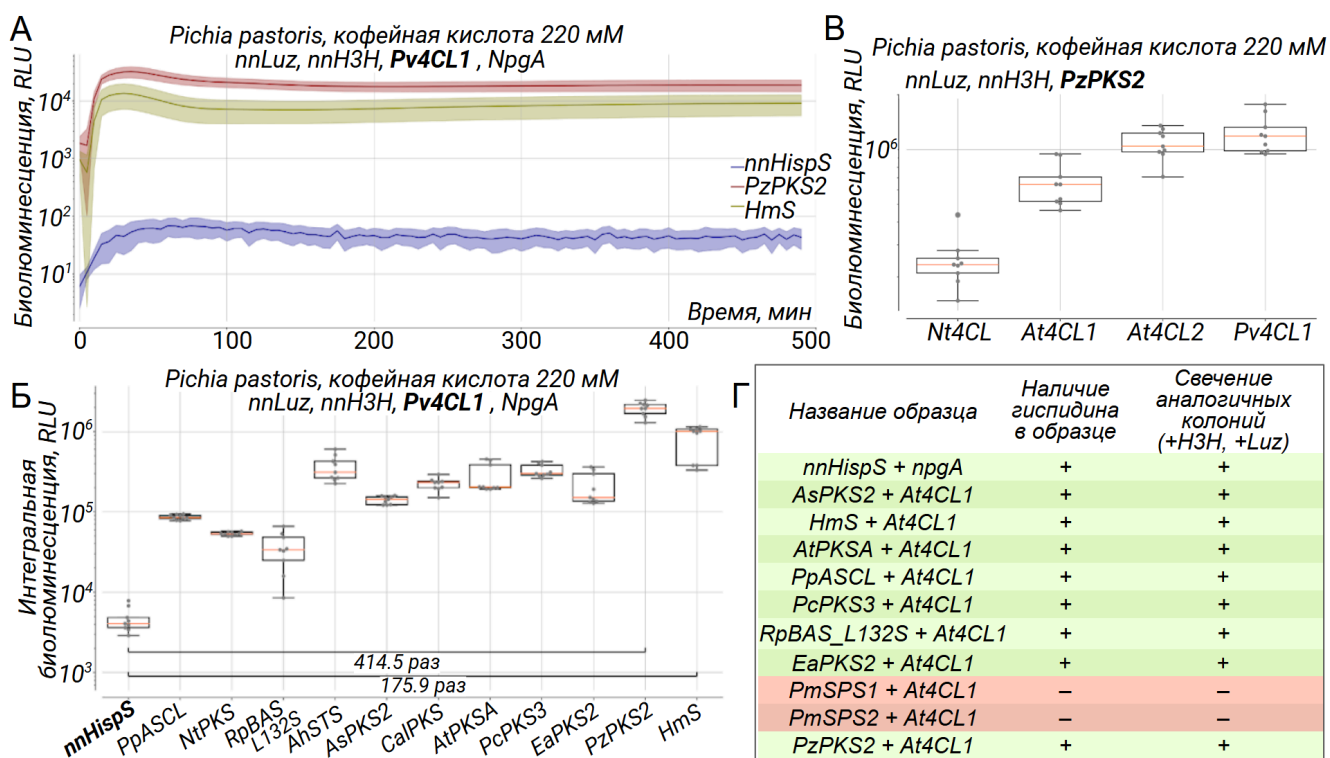
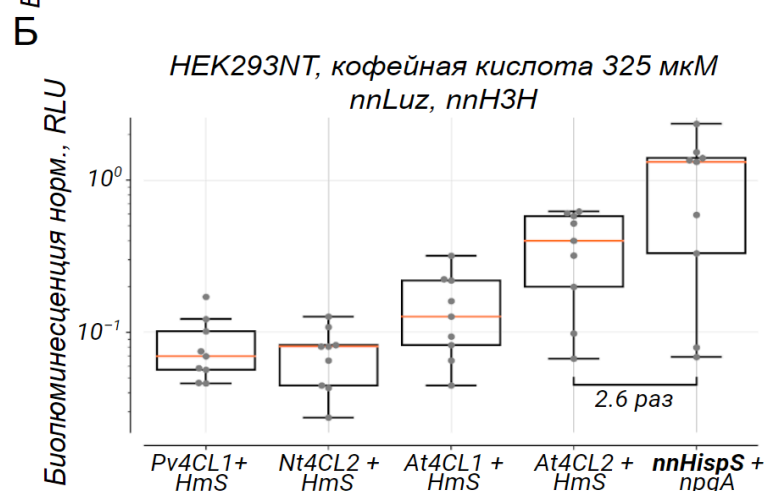
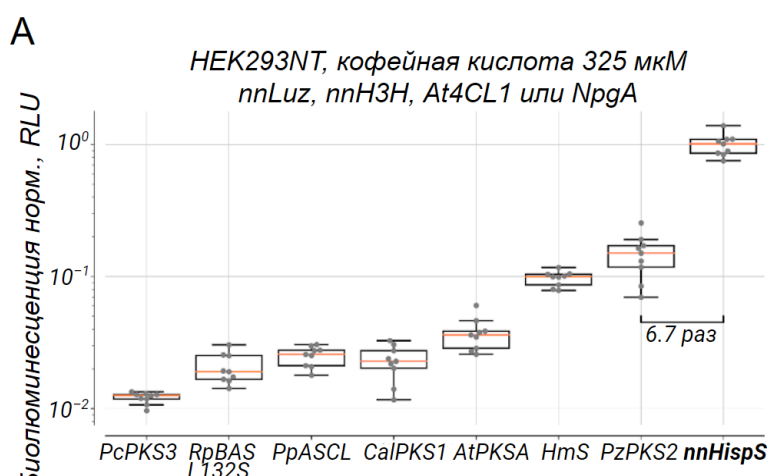


Рисунок 4. Биолуминесцентный сигнал *P. pastoris* при добавлении 220 мМ кофейной кислоты. Линии дрожжей экспрессировали гены ферментов nnLuz, nnH3H, nnHispS с NpgA или гены PKS растений, а также Pv4CL1 (А, Б). (В) Сравнение 4CL в клетках *P. pastoris*, экспрессирующих гены ферментов nnLuz, nnH3H, PzPKS2, при добавлении кофейной кислоты 220 мМ. (Г) Результаты ВЭЖХ-МС/МС анализа линий *P. pastoris*, экспрессирующих гены PKS, At4CL1 или nnHispS, NpgA.

Анализ функционирования ПКС растений в клетках млекопитающих

Мы провели оценку работы ПКС растений для исследований в млекопитающих на модельной системе – модифицированной культуре клеток почки эмбриона человека HEK293NT, в сравнении с биолюминесцентной системой грибов. Сравнение проводили по уровню люминесцентного сигнала при добавлении кофейной кислоты к клеткам. Оказалось, что в отличие от экспрессии в дрожжах, рассмотренной выше, все растительные ПКС оказались менее эффективны, чем гиспидинсинтаза биолюминесцентной системы грибов. Хотя ферменты, демонстрирующие наиболее яркий сигнал среди ПКС растений, были такие же, как и в клетках *P. pastoris* – HmS, PzPKS2. Нам удалось



подобрать более эффективный 4CL – At4CL2, и добиться повышения уровня сигнала примерно в 2 раза. Однако даже пара HmS и At4CL2 показывала уровень люминесценции ниже, чем система с гиспидинсинтазой *N. nambi* (рис.5).

Рисунок 5.

Биолюминесцентный сигнал клеток млекопитающих HEK293NT при добавлении кофейной кислоты 325 мкМ. (А) Клетки экспрессировали гены ферментов nnLuz, nnH3H, nnHispS с NpgA или гены ПКС растений совместно с At4CL1. (Б) Клетки экспрессировали гены ферментов nnLuz, nnH3H, HmS и разные гены 4CL.

Анализ функционирования ПКС растений в клетках растений

Культура растительных клеток и сами растения представляют собой особую систему, в которой субстрат, необходимый для биолюминесценции – кофейная кислота, присутствует эндогенно, как метаболит фенилпропаноидного пути. Для нашей цели: проверки активности ПКС растений и сравнения их между собой, вместе с ферментами биолюминесцентной системы *N. nambi*, суспензионная культура клеток табака Bright Yellow-2 (BY-2), стала удобным инструментом скрининга. Для данного анализа мы использовали те ПКС, которые ранее показали свою функциональность в клетках *P. pastoris* (рис.6). При этом наличие эндогенной активности 4CL позволяет использовать для

синтеза гиспидина только ПКС III типа, заменяя пару HispS и NpgA, что удобно для сокращения размера доставляемой генетической конструкции. Анализируя результаты агробактериальной трансформации клеток BY-2 и работу растительных ПКС при временной экспрессии, мы отметили, что 14 из рассмотренных ферментов приводили к биолюминесценции при коэкспрессии с генами ферментов биолюминесцентной системы *N. nambi* nnLuz, nnH3H, nnCPH. Однако уровень сигнала гибридной биолюминесцентной системы с ПКС растений был ниже, чем у системы с nnHispS из *N. nambi*, примерно в 6-7 раз.

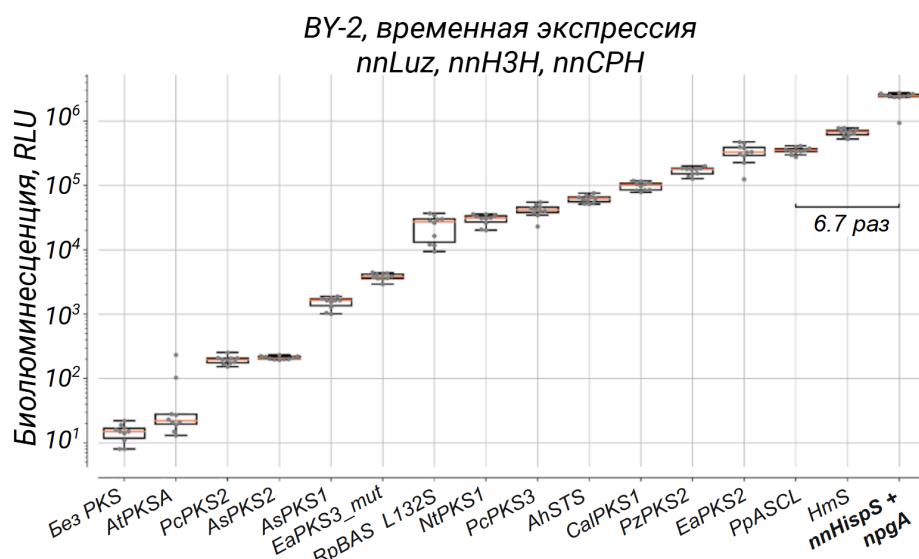


Рисунок 6.

Биолюминесцентный сигнал клеток BY-2, экспрессирующих гены ферментов nnLuz, nnH3H, nnCPH и разные ПКС растений, а также nnHispS и NpgA, без добавления субстрата.

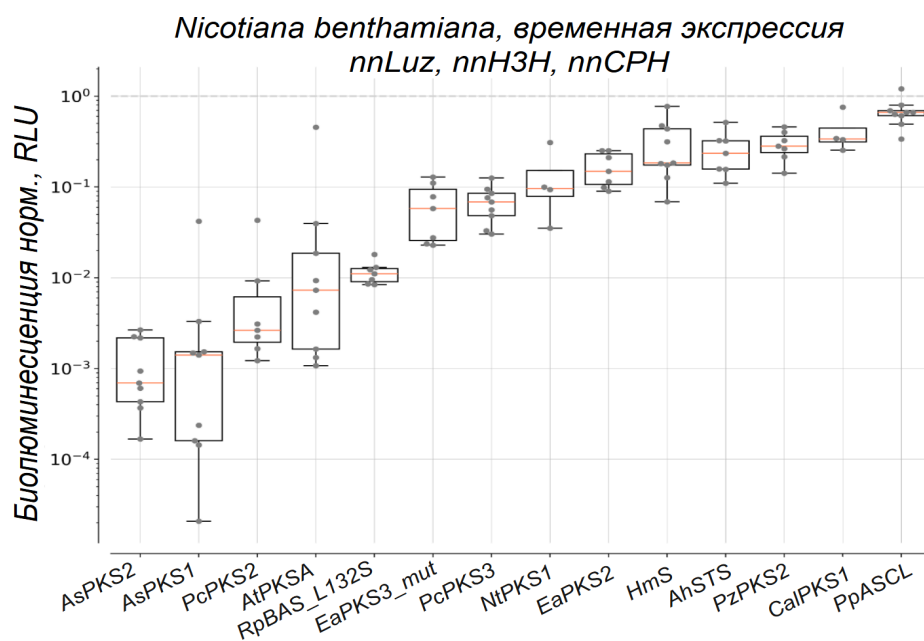


Рисунок 7.

Биолюминесцентный сигнал агроинfiltrаций листьев *Nicotiana benthamiana*, экспрессирующих гены ферментов nnLuz, nnH3H, nnCPH и разных ПКС растений, нормированный на сигнал агроинfiltrаций листьев *Nicotiana benthamiana*,

экспрессирующих гены ферментов nnLuz, nnH3H, CPH, nnHispS и NpgA, без добавления субстрата.

Инfiltrация растительных тканей агробактериями (далее – агроинfiltrация) представляет собой универсальный, простой и эффективный метод доставки трансгенов в растительные клетки для анализа временной экспрессии генов интересующих ферментов и их сочетаний. Агроинfiltrации

в листьях *N. benthamiana* также показали работу растительных ПКС при временной коэкспрессии с генами ферментов биолуминесцентной системы *N. nambi*. В данной гетерологической системе так же, как и в клетках BY-2, не было необходимости в экспрессии дополнительного гена 4CL. Сравнение эффективности ПКС растений в листьях *N. benthamiana* показало высокий уровень сигнала для ферментов PzPKS2, CalPKS1, и PrASCL, сравнимый с контролем – nnHisS и NpgA (рис.7).

Кроме того, мы провели ВЭЖХ-МС/МС анализ образцов растений для того, чтобы изучить соединения, образующиеся в ходе работы ПКС. Мы использовали агроинфильтрацию для временной экспрессии PrASCL, либо nnHisS с NpgA в листьях *N. benthamiana*. В этом случае мы ожидали накопления продукта поликетидсинтаз в листьях. Для того, чтоб оценить долю гиспидина, вовлеченного в следующий этап биолуминесцентного каскада, дополнительно экспрессировали nnH3H. В качестве отрицательных контролей использовали листья, агроинфильтрированные EGFP, и без инфильтрации.

Согласно полученным данным, мы достоверно детектировали кофейную кислоту, а ее уровень во всех образцах был не отличим от отрицательных контролей (рис.8 А). Это может свидетельствовать о том, что стабильная концентрация гидроксикоричных кислот поддерживается на определенном уровне и расход этих метаболитов восполняется за счет внутренних запасов клеток.

Кроме того, во всех образцах растений, экспрессирующих гены PrASCL либо nnHisS с NpgA, был обнаружен гиспидин (рис.8 Б). Отличие в уровне сигнала этих образцов от контроля было значительное и превышало несколько порядков. В образцах с nnH3H, как и ожидалось, содержание гиспидина было ниже. Данные, полученные на растениях согласуются с данными, полученным на дрожжах (рис.4 Г), а значит поликетидсинтазы растений производят гиспидин. Таким образом, небольшие растительные поликетидсинтазы могут функционально заместить поликетидсинтазу грибов и фосфопантетеин-трансферазу в гибридной автономной биолуминесцентной системе.

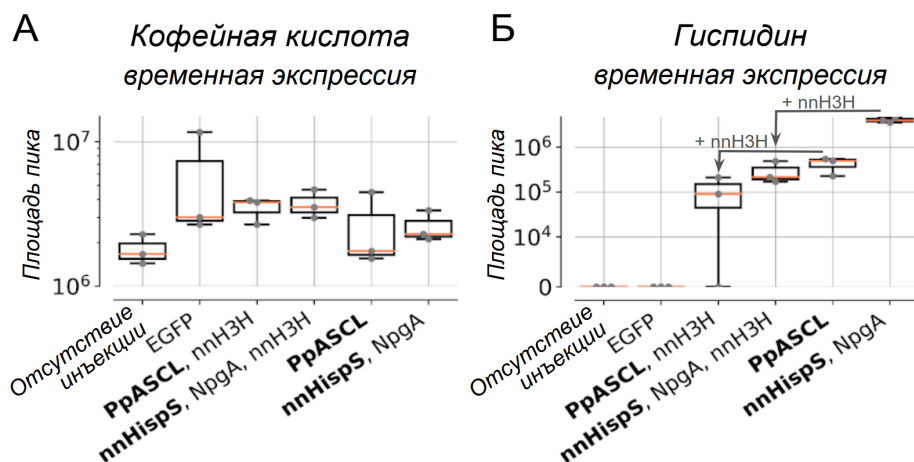


Рисунок 8.

Данные ВЭЖХ-МС/МС для листьев *N. benthamiana*, отражающие содержание кофейной кислоты (А) и гиспидина (Б). Образцы растений, которые экспрессировали гены PrASCL, или

PrASCL с nnH3H, или nnHisS с NpgA, или nnHisS с NpgA и nnH3H, а также контрольные образцы, экспрессирующие EGFP, и листья без агроинфильтрации.

Сравнение гибридной биолуминесцентной системы с описанными ранее люциферин-люциферазными реакциями

Биолуминесценция – важный инструмент растительной биологии и биотехнологии, который позволяет анализировать экспрессию циркадных генов, белок-белковые взаимодействия и многие другие процессы. Часто среди репортеров используют люциферазу светлячка *Photinus pyralis* – FFLuc и искусственно оптимизированную люциферазу *Oplophorus gracilirostris* – NanoLuc. Мы провели сравнение созданной гибридной биолуминесцентной системы с другими репортерами.

По сравнению с системами, требующими добавления субстрата, свечение гибридной автономной системы в растительных клетках BY-2 было тусклее, но сопоставимо (рис.9 А). В клетках *P. pastoris* добавление субстратов было необходимо во всех образцах, и гибридные системы на основе ПКС растений показали уровень свечения выше, чем FFLuc. Так, линия, экспрессирующая HmS, демонстрировала сигнал примерно в 40 раз превышающий свечение FFLuc и в 12 раз слабее NanoLuc (рис.9 Б). Таким образом, гибридная автономная биолуминесцентная система может стать инструментом для проведения скринингов на модели клеточных культур.

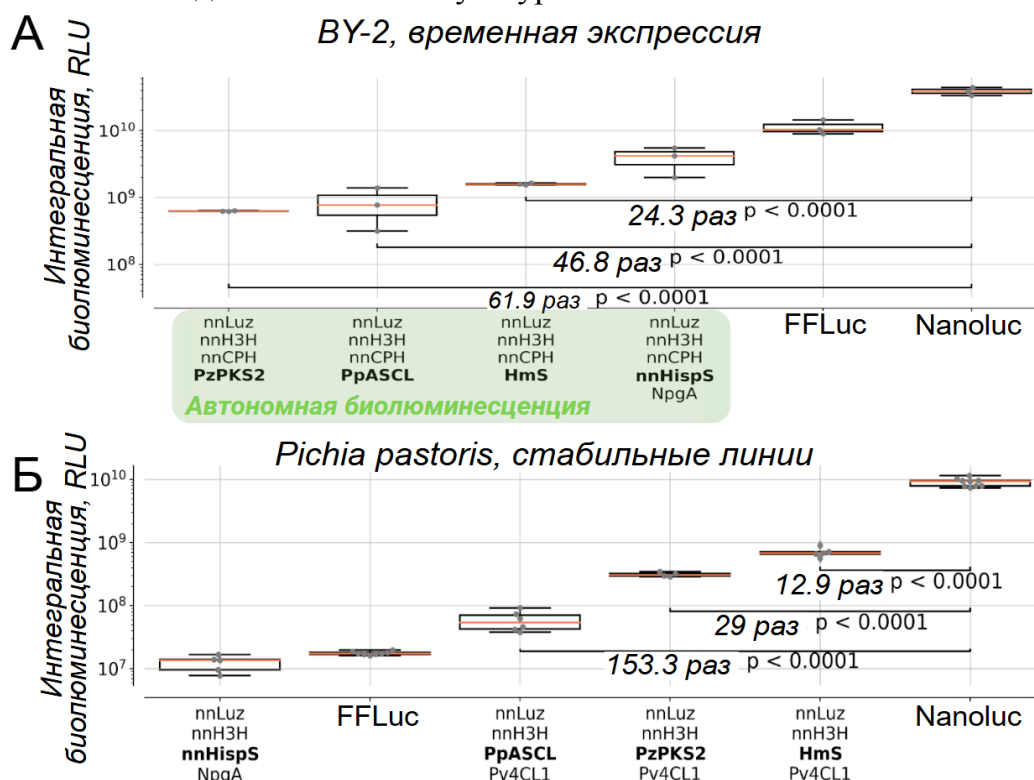


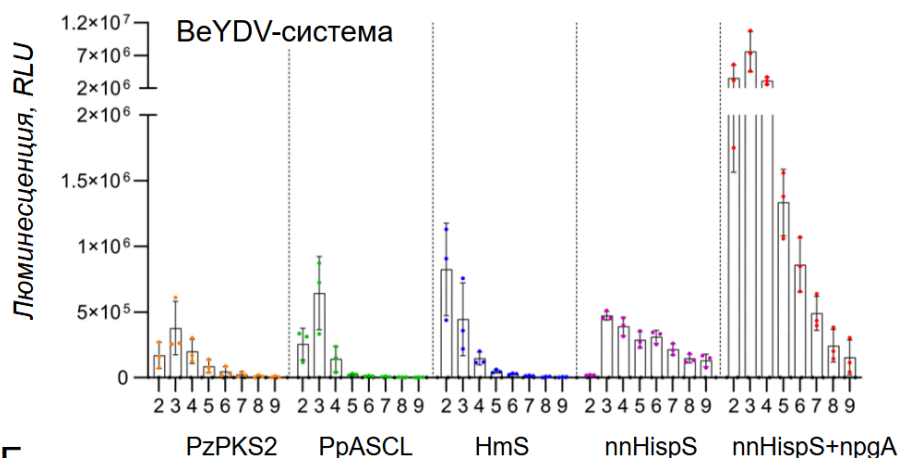
Рисунок 9. А) Сравнение биолуминесцентных систем при временной экспрессии в клетках BY-2: гибридной системы с ПКС растений и ферментами *N. nambi* (HmS, PzPKS2, или PpASCL, nnLuz, nnH3H, nnCPH), системы *N. nambi* (nnHispS, NpgA, nnLuz, nnH3H, nnCPH), люциферазы светлячка (FFLuc) и NanoLuc. (Б) Сравнение стабильных линий дрожжей, экспрессирующих гены биолуминесцентных систем: гибридной системы (HmS, PzPKS2, или PpASCL с Pv4CL1, nnLuz и nnH3H), системы *N. nambi* (nnHispS, NpgA, nnLuz и nnH3H), люциферазы светлячка (FFLuc) и NanoLuc. Субстрат добавляли в концентрации 100 мМ. Для NanoLuc использовали концентрацию субстрата, рекомендованную производителем.

Создание вирусных конструкций, несущих гены поликетидсинтаз III типа растений и гиспидинсинтазы *N. nambi*

Ранее мы упоминали, что размер генетической конструкции в некоторых случаях может быть критичен для доставки с помощью вирусных систем. Для того, чтоб оценить, способность поликетидсинтаз III типа заменить крупную гиспидинсинтазу грибов в вирусных векторах группа Диего Орзаеса (Universitat Politècnica de València) провела сравнение nnHispS и выбранных нами поликетидсинтаз растений: PpASCL, HmS, PzPKS2. Для анализа использовали репликативные вирусные системы на основе вируса табачной мозаики (TMV), чувствительной к размеру РНК, а также вируса желтой карликовости фасоли (BeYDV), нечувствительный к размеру ДНК.

Как и ожидалось, в случае BeYDV биолюминесцентный каскад грибов и гибридный биолюминесцентный путь демонстрировали сигналы биолюминесценции (рис.10). В случае TMV большой размер nnHispS затруднял репликативный цикл вируса, в результате люминесценция инфильтрированных листьев не детектировалась. Напротив, все три протестированных гена поликетидсинтаз растительного происхождения позволяли регистрировать биолюминесценцию при доставке TMV-системой. Этот результат показывает преимущество гибридного биолюминесцентного пути для практических приложений, которые чувствительны к размеру доставляемой конструкции.

А



Б

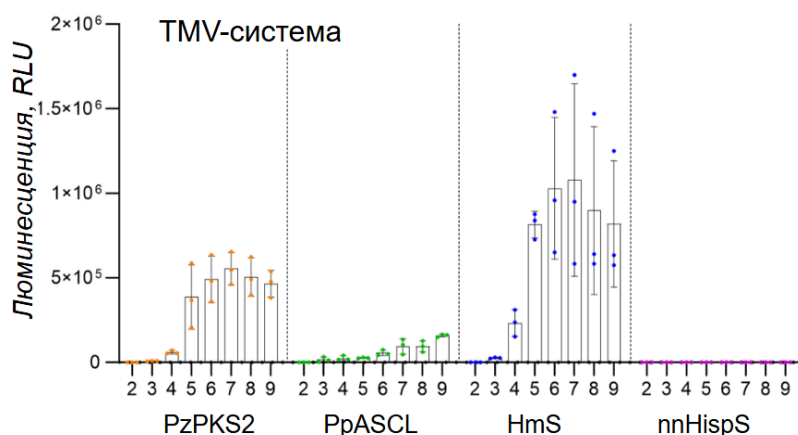


Рисунок 10.

Люминесценция листьев *Nicotiana benthamiana*, экспрессирующих поликетидсинтазы PzPKS2, PpASCL, HmS и nnHispS доставленных в растительную клетку с помощью (А) репликативной системы BeYDV и (Б) репликативной системы TMV. Измерения проводились со 2 по 9 день после инфильтрации. Каждая поликетидсинтаза коэкспрессируется с nnLuz, nnH3H, nnCPH, P19 и eGFP (и ± NpgA совместно с nnHispS).

Стабильные линии растений с гибридной биолюминесцентной системой

Для анализа работы *in vivo* гибридной биолюминесцентной системы с ПКС растений и ферментами *N. nambi*, были созданы стабильные линии *N. benthamiana* с одной из наиболее эффективных ПКС в экспериментах на растениях – PrASCL. С помощью агробактериальной трансформации были получены растения, стабильно экспрессирующие гены PrASCL и гены биолюминесцентной системы *N. nambi* nnLuz, nnH3H, nnCPH. Данная работа была проведена совместно с Татьяной Митюшкиной и Татьяной Каратаевой (Лаборатория молекулярных основ стрессоустойчивости растений, ФИБХ РАН).

Все полученные стабильные линии *N. benthamiana* демонстрировали устойчивое свечение. Яркость линий с PrASCL находилась на одном уровне с ранее опубликованной линией с nnHisps без NpgA (Mitouchkina и др. 2020), однако была слабее примерно на порядок в сравнении с уровнем сигнала от линии с nnHisps и NpgA (Shakhova и др. 2024). При этом с возрастом растений отличия в биолюминесценции линий становились меньше. На стадии цветения наибольшая яркость наблюдалась для цветов для всех анализируемых линий (рис.11).

Анализируя биолюминесцентный сигнал гибридной системы на стабильных линиях растений, уступающий по яркости с биолюминесценции системы грибов, можно выдвинуть ряд гипотез. В пути преобразования кофейной кислоты в люциферин отличия могут вносить биохимические характеристики этих ферментов (ПКС и nnHisps). С другой стороны, в растениях присутствует множество других гидроксикоричных кислот, которые могут быть ингибиторами ПКС, либо метаболизироваться с их помощью до ингибиторов остальных ферментов биолюминесцентной системы. Наконец, регуляция ферментов фенилпропаноидного пути в растениях может не влиять на nnHisps – фермент из таксономически отдаленного организма, но затрагивать ПКС – белок растительного происхождения. Некоторые из этих гипотез мы проверили и описали ниже.

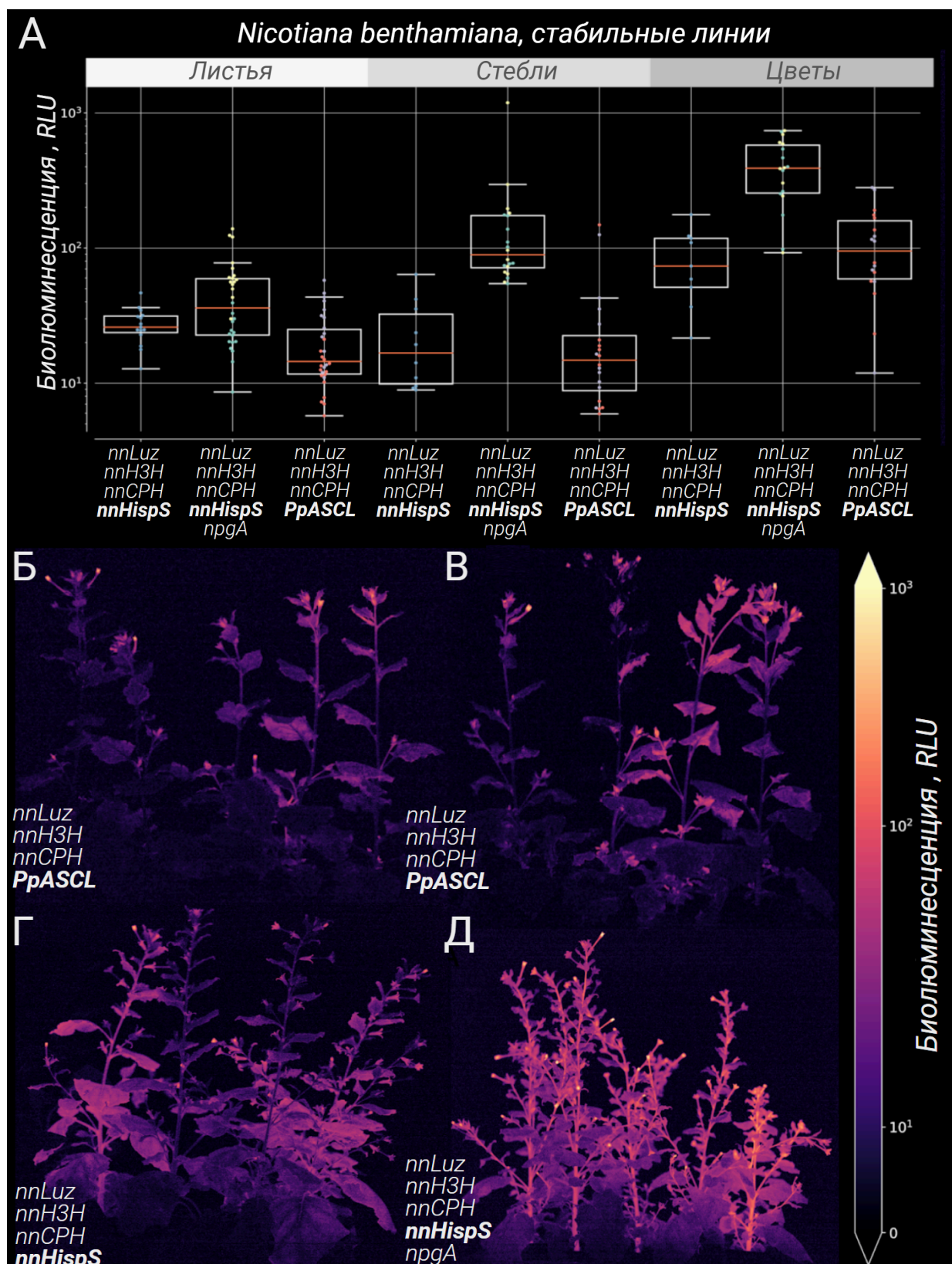


Рисунок 11. Трансгенные растения *N. benthamiana*, экспрессирующие разные варианты биолуминесцентного пути. (А) Средняя яркость листьев, стеблей и цветов у 9-10 недельных растений. (Б) Фотография трансгенных растений, экспрессирующих гены nnHisps, nnLuz, nnH3H и nnCPH. (В, Г) Фотография трансгенных растений, экспрессирующих гены PpASCL, nnLuz, nnH3H и nnCPH. (Д) Фотография трансгенных растений, экспрессирующих гены nnHisps, NpgA, nnLuz, nnH3H и nnCPH.

Анализ инъекции метаболитов в листья стабильных линий *N. benthamiana*

Данный анализ был посвящен поиску лимитирующей реакции с помощью инъекции в листья стабильных линий метаболитов биoluminesцентного пути: кофейной кислоты, гиспидина и люциферина. Согласно опубликованным данным, концентрация кофейной и других гидроксикоричных кислот может варьировать в диапазоне 10-100 мкМ (Mitouchkina и др. 2020; Chaowuttikul и др. 2020). Таким образом, мы использовали концентрации, близкие к физиологическим и превышающие их, для выявления лимитирующего этапа.

В качестве контроля использовали линию без ПКС, экспрессирующую гены nnLuz, nnH3H, nnCPH. Данная линия, как ожидалось, не реагировала свечением на инъекции кофейной кислоты, и при этом показывала биoluminesцентный сигнал при инъекциях люциферина или гиспидина (рис.12 А, Б, В).

Nicotiana benthamiana, листья стабильных линий

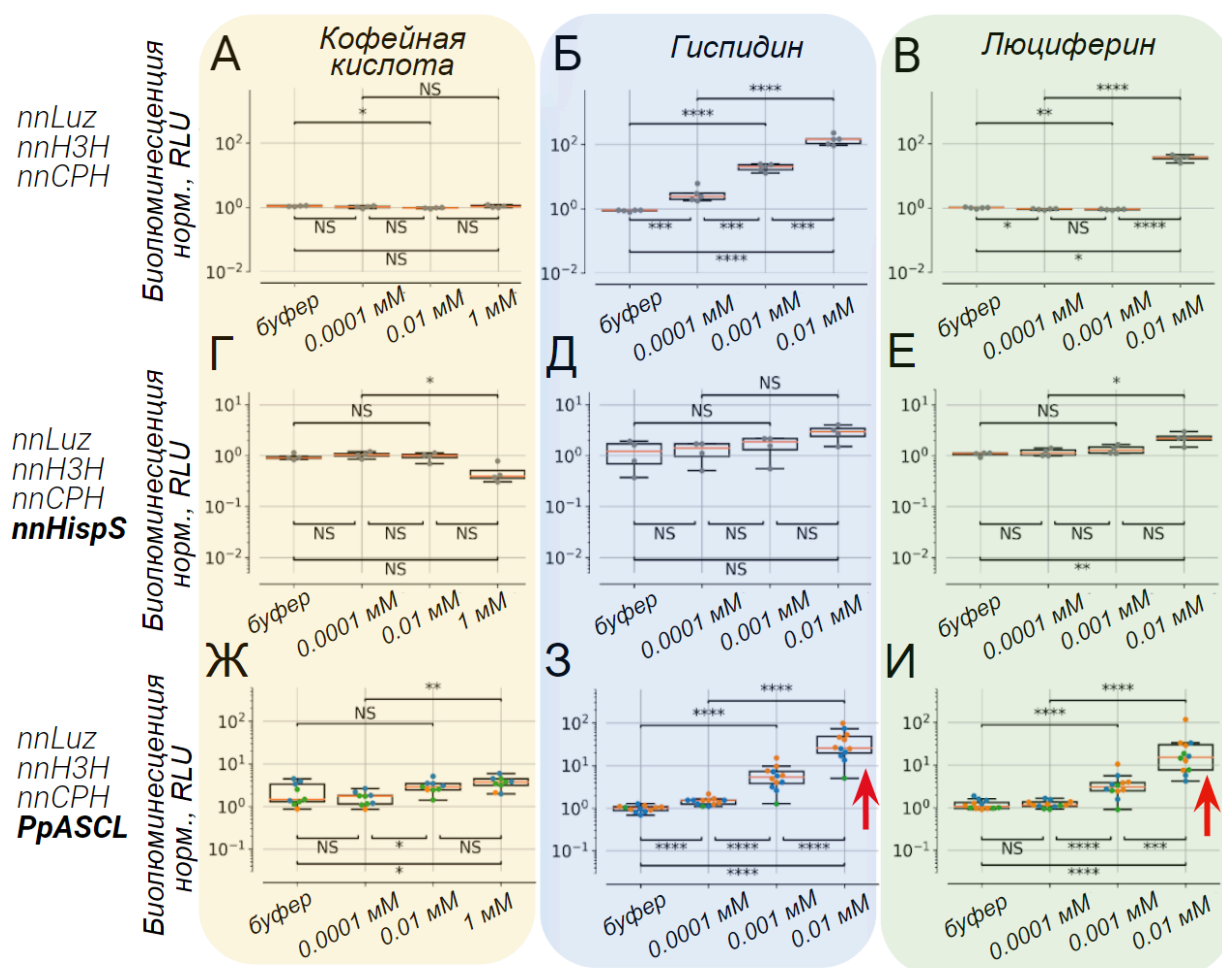


Рисунок 12. Инъекции кофейной кислоты, гиспидина и люциферина в листья линий *N. benthamiana*, конститутивно экспрессирующих гены nnLuz, nnH3H, nnCPH без поликетидсинтазы (А-В), с nnHisps и NrgA (Г-Е) или с PpASCL (Ж-И).

Анализ инъекций кофейной кислоты показал, что линии, экспрессирующие ПКС и nnHisps, не приводят к значительному увеличению яркости свечения (рис.12 Г, Ж). Это скорее всего указывает на то, что доступность кофейной кислоты не является лимитирующим фактором для

биолюминесценции. При этом инъекции гиспицина и люциферина приводят к росту биолюминесценции для линий с PpASCL (рис.12 З, И), что указывает на то, что биосинтез гиспицина остается лимитирующей стадией в этих линиях.

Анализ агроинфильтраций для экспрессии генов ПКС и 4CL в стабильных линиях *N. benthamiana* для определения лимитирующей стадии

Предположив, что лимитирующей стадией является биосинтез гиспицина, мы решили рассмотреть ее более подробно, анализируя оба этапа превращения: трансформацию кофейной кислоты в КоА-производное, катализируемую 4CL, и само образование гиспицина, катализируемое ПКС растений. Данное исследование проводили путем агроинфильтраций стабильных линий *N. benthamiana* и анализа временной экспрессии PpASCL и Pv4CL1.

По результатам работы мы выяснили, что довол смеси агробактерий для гиперэкспрессии PpASCL, но не Pv4CL1 приводит к увеличению уровня биолюминесценции (рис.13). Это говорит о том, что именно стадия, катализируемая ПКС, лимитирует биосинтез гиспицина. Кроме того, любопытно, что гиперэкспрессия Pv4CL1 снижает уровень биолюминесценции линии, стабильно экспрессирующей ген nnHispS, что может отражать конкуренцию этих ферментов за субстрат – кофейную кислоту.

Nicotiana benthamiana, листья стабильных линий

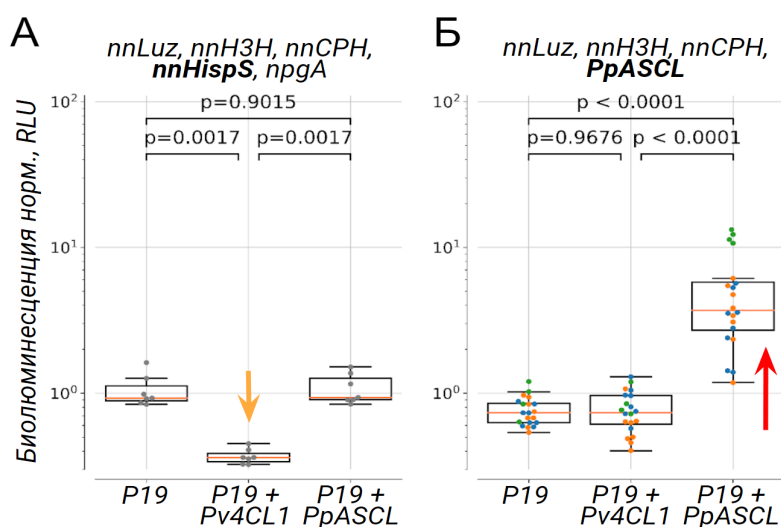


Рисунок 13. Временная экспрессия PpASCL и Pv4CL1 (P19 в качестве контроля) в листьях стабильных линий *N. benthamiana*, экспрессирующих nnLuz, nnH3H, nnCPH (А) с nnHispS и NpgA или (Б) PpASCL.

Анализ инъекции MG132 – ингибитора деградации путем убиквитинилирования – в листья *N. benthamiana*

Низкая активность ПКС, по нашим предположениям, могла быть связана с тем, что данный фермент подвергается деградации путем убиквитинилирования. Эта гипотеза была основана на том, что такой способ регуляции ранее был описан для CHS (Мао и др. 2022). В литературе для подтверждения такого способа регуляции использовали ингибитор 26S-протеасомной деградации – MG132 (Lyzenga и др. 2012), который мы также проанализировали в работе.

Мы производили инъекции MG132 в стабильные линии *N. benthamiana*, экспрессирующие гены ПКС, либо nnHispS с NpgA совместно с другими генами ферментов биолюминесцентного пути: nnLuz, nnH3H, nnCPH. Согласно

полученным результатам, добавление ингибитора убиквитин-зависимой деградации не привело к росту сигнала (рис.14). Это может свидетельствовать о том, что деградация ПКС не вносит заметного вклада в регуляцию работы данного фермента на стабильных линиях.

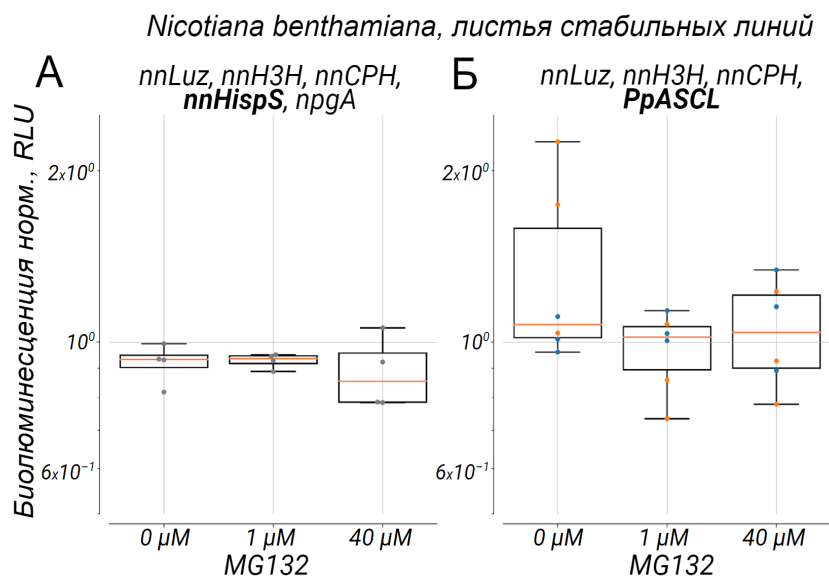


Рисунок 14. Проверка гипотезы убиквитин-зависимой деградации ПКС. Биолюминесцентный сигнал за 16 ч после инъекции MG132 в концентрациях 0 μM , 1 μM , 40 μM , которые проводили в листья *N. benthamiana*, стабильно экспрессирующие *nnLuz*, *nnH3H*, *nnCPH* и *nnHispS* с *NpgA* (А) или *PpASCL* (Б).

Выводы

1. Впервые показано, что биолюминесцентный каскад, включающий *nnHispS*, *NpgA*, *nnLuz*, *nnH3H*, может функционировать в клетках дрожжей при добавлении кумаровой и феруловой кислот, что указывает на широкую субстратную специфичность всех ферментов биолюминесцентной системы грибов;
2. Среди поликетидсинтаз небиолюминесцентных грибов обнаружен фермент *hsPKS* из *Hypholoma sublateritium*, обеспечивающий на модели клеток дрожжей биолюминесценцию совместно с ферментами *NpgA*, *nnLuz*, *nnH3H*;
3. Делеция кеторедуктазного и дегидратазного доменов, отличающих поликетидсинтазы *hsPKS*, *cgPKS*, *gcPKS* из небиолюминесцентных грибов от *nnHispS* биолюминесцентного гриба *N. nambi*, не приводит к появлению гиспидинсинтазной активности этих ферментов;
4. Впервые создан гибридный биолюминесцентный каскад, состоящий из поликетидсинтаз III типа и 4-кумароил-КоА-лигаз растений, а также ферментов *nnLuz* и *nnH3H*, активный при добавлении кофейной кислоты в клетках дрожжей и млекопитающих. Наибольшая интенсивность биолюминесценции наблюдалась для поликетидсинтазы из свинчатки и гортензии в сочетании с 4-кумароил-КоА-лигазами из резуховидки и просо;
5. На модели клеток дрожжей показано, что поликетидсинтазы III типа из эволюционно далеких растений, включая мохообразные, хвощи, однодольные и двудольные, способны в паре с 4-кумароил-КоА-лигазой производить гиспидин из кофейной кислоты;

6. В растениях поликетидсинтазы III типа смогли заменить два фермента – nnHisps и NrgA, значительно сократив размер генетической конструкции для автономной биолуминесценции. При этом наиболее яркий сигнал регистрировали для фермента из мха (*Physcomitrella patens*);

7. Анализ стабильных линий *N.benthamiana* показал, что гибридная биолуминесцентная система функциональна на разных этапах развития растения, а стадия, катализируемая поликетидсинтазой III типа является лимитирующей.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Palkina K.A., Ipatova D.A., Shakhova E.S., Balakireva A.V., Markina N.M. Therapeutic potential of hispidin—fungal and plant polyketide //Journal of Fungi. – 2021. – Т. 7. – №. 5. – С. 323.
2. Palkina, K. A., Balakireva, A. V., Belozerova, O. A., Chepurnykh, T. V., Markina, N. M., Kovalchuk, S. I., Tsarkova A.S., Mishin, A. S., Yampolsky I.V., Sarkisyan, K. S. Domain truncation in hispidin synthase orthologs from non-bioluminescent fungi does not lead to hispidin biosynthesis //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 2. – С. 1317.
3. Palkina K. A.*, Karataeva T.A.*, Perfilov M.M.*, Fakhranurova L.I.*, Markina N.M., Gonzalez Somermeyer L., Garcia-Perez E., Vazquez-Vilar M., Rodriguez-Rodriguez M., Vazquez-Vilriales V., Shakhova E.S., Mitouchkina T., Belozerova O.A., Kovalchuk S.I., Alekberova A., Malyshevskaya A.K., Bugaeva E.N., Guglya E.B., Balakireva A., Sytov N., Bezlikhotnova A., Boldyreva D.I., Babenko V.V., Kondrashov F.A., Choob V.V., Orzaez D., Yampolsky I.V., Mishin A.S., Sarkisyan K. S. A hybrid pathway for self-sustained luminescence //Science Advances. – 2024. – Т. 10. – №. 10. – С. eadk1992.

* равный вклад авторов

Список используемой литературы

1. Beckert C. и др. Styrylpyrone biosynthesis in Equisetum arvense //Phytochemistry. – 1997. – Т. 44. – №. 2. – С. 275-283.
2. Bisht R. и др. An overview of the medicinally important plant type III PKS derived polyketides //Frontiers in Plant Science. – 2021. – Т. 12. – С. 746908.
3. Calvache C. и др. A quantitative autonomous bioluminescence reporter system with a wide dynamic range for Plant Synthetic Biology //Plant Biotechnology Journal. – 2024. – Т. 22. – №. 1. – С. 37-47.
4. Chaowuttikul C., Palanuvej C., Ruangrunsi N. Quantification of chlorogenic acid, rosmarinic acid, and caffeic acid contents in selected Thai medicinal plants using RP-HPLC-DAD //Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2020. – Т. 56. – С. e17547.
5. Chiong K. T., Cody W. B., Scholthof H. B. RNA silencing suppressor-influenced performance of a virus vector delivering both guide RNA and Cas9 for CRISPR gene editing //Scientific Reports. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 6769.
6. Dong J. Y., Fan P. D., Frizzell R. A. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus //Human gene therapy. – 1996. – Т. 7. – №. 17. – С. 2101-2112.
7. Ge J. и др. Integration of biological and information technologies to enhance plant autoluminescence //The Plant Cell. – 2024. – Т. 36. – №. 11. – С. 4703-4715.
8. Kaskova Z. M. и др. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence //Science advances. – 2017. – Т. 3. – №. 4. – С. e1602847.
9. Ke H. M. и др. Mycena genomes resolve the evolution of fungal bioluminescence //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – Т. 117. – №. 49. – С. 31267-31277.
10. Khakhar A. и др. Building customizable auto-luminescent luciferase-based reporters in plants //Elife. – 2020. – Т. 9. – С. e52786.
11. Kotlobay A. A. и др. Genetically encodable bioluminescent system from fungi //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – Т. 115. – №. 50. – С. 12728-12732.
12. Lee I.K., Yun B.S. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi Phellinus and Inonotus spp., and their medicinal importance//The Journal of antibiotics. – 2011. – Т. 64. – №. 5. – С. 349-359.
13. Lyzenga W. J., Booth J. K., Stone S. L. The Arabidopsis RING-type E3 ligase XBAT32 mediates the

- proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7 //The Plant Journal. – 2012. – Т. 71. – №. 1. – С. 23-34.
14. Mao W. и др. Low temperature inhibits anthocyanin accumulation in strawberry fruit by activating FvMAPK3-induced phosphorylation of FvMYB10 and degradation of Chalcone Synthase 1 //The Plant Cell. – 2022. – Т. 34. – №. 4. – С. 1226-1249.
 15. Mitouchkina T. и др. Plants with genetically encoded autoluminescence //Nature Biotechnology. – 2020. – Т. 38. – №. 8. – С. 944-946.
 16. Oliveira A. G. и др. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages //Photochemical&Photobiological Sciences.–2012.–Т.11.–С. 848-852.
 17. Pluskal T. и др. The biosynthetic origin of psychoactive kavalactones in kava //Nature plants. – 2019. – Т. 5. – №. 8. – С. 867-878.
 18. Purtov K. V. и др. The chemical basis of fungal bioluminescence //Angewandte Chemie. – 2015. – Т. 127. – №. 28. – С. 8242-8246.
 19. Shakhova E. S. и др. An improved pathway for autonomous bioluminescence imaging in eukaryotes //Nature Methods. – 2024. – Т. 21. – №. 3. – С. 406-410.
 20. Suárez-López P., Gutiérrez C. DNA replication of wheat dwarf geminivirus vectors: effects of origin structure and size //Virology. – 1997. – Т. 227. – №. 2. – С. 389-399.
 21. Wang M. и др. Gene targeting by homology-directed repair in rice using a geminivirus-based CRISPR/Cas9 system //Molecular plant. –2017. – Т. 10. – №. 7. – С. 1007-1010.
 22. Xu C. L. и др. Viral delivery systems for CRISPR //Viruses.–2019.– Т. 11. – №. 1. – С. 28.
 23. Zheng P. и др. Metabolic engineering and mechanical investigation of enhanced plant autoluminescence //Plant Biotechnology Journal. – 2023. – Т. 21. – №. 8. – С. 1671-1681.