

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

---

На правах рукописи

Палкина Ксения Андреевна

**Ферменты биосинтеза поликетидов гиспидина  
из кофейной кислоты**

Специальность 1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
к.б.н. Мишин Александр Сергеевич

Москва – 2025

## Содержание

Список сокращений	5
<b>Введение</b>	<b>11</b>
<b>Актуальность темы исследования</b>	<b>11</b>
<b>Степень разработанности области исследования</b>	<b>12</b>
<b>Цель и задачи исследования</b>	<b>13</b>
<b>Научная новизна и практическая значимость работы</b>	<b>14</b>
<b>Основные положения, выносимые на защиту</b>	<b>15</b>
<b>Степень достоверности результатов</b>	<b>15</b>
<b>Апробация работы и публикации</b>	<b>16</b>
<b>Глава 1. Обзор литературы</b>	<b>17</b>
1.1. Биологическая роль гидроксикоричных кислот в растениях и грибах	17
1.1.1. Метаболизм гидроксикоричных кислот в растениях	17
1.1.2. Метаболизм гидроксикоричных кислот в грибах	20
1.2. Ферменты биосинтеза гиспидина – поликетидсинтазы	23
1.2.1. Биосинтез гиспидина грибами ПКС	27
1.2.2. Биосинтез гиспидина и его аналогов в растениях с помощью ПКС III типа	30
1.3. Медицинские свойства гиспидина	35
1.4. Роль гиспидина в биолюминесценции грибов	36
1.5. Гетерологическая экспрессия генов ферментов биосинтеза поликетидов	40
1.5.1. Выбор гетерологического хозяина для производства поликетидов	40
1.5.2. Подходы к оптимизации биосинтеза поликетидов	42
1.5.2.1. Увеличение доступности КоА-тиоэфиров – субстратов ПКС	43
1.5.2.2. Увеличение доступности малонил-КоА	45
1.5.2.3. Совместное культивирование штаммов	47
<b>Глава 2. Материалы и методы</b>	<b>49</b>
2.1 Методы молекулярной биологии	49
2.1.1 Дизайн векторов для дрожжей	49
2.1.1.1 Дизайн векторов для экспрессии ПКС небиолюминесцентных грибов	49
2.1.1.1 Дизайн векторов для экспрессии ПКС III типа и 4CL из растений	49
2.1.2 Дизайн векторов для клеток млекопитающих	50
2.1.3 Дизайн векторов для растений	50
2.1.4 Создание генетических конструкций	51
2.1.4.1 Химический синтез последовательностей ДНК	51
2.1.4.2 Амплификация ДНК	51
2.1.4.3 Электрофорез ДНК в агарозном геле	51
2.1.4.4 Экстракция ДНК из реакционной смеси или из агарозного геля после электрофоретического разделения	52
2.1.4.5 Реакция модульного клонирования	52
2.1.4.6 Выделение плазмидной ДНК	52

2.1.4.7 Секвенирование ДНК по методу Сэнгера	53
2.1.5 Методы работы с бактериями	53
2.1.5.1 Протокол приготовления компетентных бактериальных клеток	53
2.1.5.2 Трансформация клеток бактерий методом электропорации	53
2.1.6. Генотипирование и определение уровня экспрессии	54
2.1.6.1 Выделение геномной ДНК	54
2.1.6.2 Подтверждение встройки в геномную ДНК	54
2.1.6.3 ПЦР в реальном времени	54
2.2 Методы работы с дрожжами <i>Pichia pastoris GS115</i>	54
2.2.1 Протокол приготовления компетентных клеток дрожжей	54
2.2.3 Трансформация клеток <i>Pichia pastoris</i> методом электропорации	55
2.2.4 Генотипирование линий дрожжей	55
2.2.5 Капельный тест (drop-test)	56
2.2.6 Анализ спектров дрожжей при добавлении аналогов кофейной кислоты	56
2.2.7 Сравнение биолюминесцентных систем в клетках дрожжей	57
2.3 Методы работы с культурами клеток млекопитающих <i>HEK293NT</i>	57
2.3.1 Ведение культуры клеток млекопитающих <i>HEK293NT</i>	57
2.3.2 Трансфекция клеток млекопитающих <i>HEK293NT</i>	58
2.4 Методы работы с культурами клеток ВУ-2	59
2.4.1 Культивирование клеток ВУ-2	59
2.4.2 Постановка временной трансформации клеток ВУ-2 в формате 96-луночного планшета	59
2.4.3 Сравнение биолюминесцентных систем	59
2.5 Методы работы с <i>N. benthamiana</i>	60
2.5.1 Растительный материал <i>N. benthamiana</i>	60
2.5.2 Агроинфильтрации в листья <i>N. benthamiana</i>	60
2.5.3 Постановка стабильной трансформации NB000	61
2.5.4 Растворы для инъекции стабильных линий	61
Растворы метаболитов	61
Раствор MG132	62
2.6 ВЭЖХ-МС/МС анализ	62
2.6.1 Приготовление образцов дрожжей	62
2.6.2 Режим съемки образцов дрожжей	62
2.6.3 Приготовление образцов растений	63
2.6.4 Режим съемки образцов растений	63
2.7 Представление данных и статистика	63
<b>Глава 3. Результаты и их обсуждение</b>	<b>66</b>
3.1 Поиск новых ферментов биосинтеза гиспицина среди ПКС небиолюминесцентных грибов	66
3.2 Анализ функционирования cgPKS, hsPKS, gcPKS и их мутантных форм в клетках дрожжей	68
3.3 ВЭЖХ-МС/МС анализ дрожжей, экспрессирующих гены ферментов	

биолюминесцентной системы с cgPKS, hsPKS, gcPKS	71
3.4 Взаимодействие cgPKS, hsPKS, gcPKS с аналогами кофейной кислоты	72
3.5 Поиск новых генов биосинтеза гиспидина из кофейной кислоты	76
3.6. Анализ функционирования отобранных ферментов и их сравнение в клетках дрожжей	79
3.6.1 Анализ и сравнение ПКС III типа из растений	79
3.6.2 Анализ и сравнение 4-кумароил-КоА-лигаз	80
3.7 Подтверждение биосинтеза гиспидина растительными ПКС с помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа	83
3.8 Сравнение гибридной биолюминесцентной системы с описанными ранее люциферин-люциферазными реакциями в клетках дрожжей	84
3.9 Анализ функционирования ферментов биосинтеза гиспидина в клетках млекопитающих <i>HEK293NT</i>	87
3.9.1 Анализ функционирования ПКС из растений в клетках млекопитающих	87
3.9.2 Анализ функционирования 4-кумароил-КоА-лигаз в клетках млекопитающих	88
3.10 Анализ функционирования ферментов биосинтеза гиспидина в клетках растений	90
3.10.1 Временная экспрессия ПКС в клетках BY-2	90
3.10.2 Временная экспрессия ПКС в листьях <i>Nicotiana benthamiana</i>	92
3.10.3 Сравнение гибридной биолюминесцентной системы с описанными ранее люциферин-люциферазными реакциями в клетках BY-2	94
3.10.4 ВЭЖХ-МС/МС анализ образцов растений, подтверждение наличия гиспидина при временной экспрессии	95
3.10.5 Создание вирусных конструкций, несущих гены поликетидсинтаз III типа растений и гиспидинсинтазы <i>N.nambi</i>	97
3.10.6 Создание стабильных линий, экспрессирующих ген ПКС растений, и анализ их свечения	99
3.10.7 Анализ инъекции метаболитов в листья стабильных линий <i>N. benthamiana</i>	101
3.10.8 Анализ агроинфильтраций для экспрессии генов ПКС и 4CL в стабильных линиях <i>N. benthamiana</i> для определения лимитирующей стадии	103
3.10.9 Анализ инъекции MG132 – ингибитора деградации путем убиквитинилирования – в листья <i>N. benthamiana</i>	104
<b>Выводы</b>	<b>106</b>
<b>Приложение</b>	<b>107</b>
Таблица 1. Выбранные кандидаты ПКС III типа из растений, анализируемые в данной работе.	107
Таблица 2. 4-Кумароил-КоА-лигазы, выбранные для работы.	112
Таблица 3. ПКС из небиолюминесцентных грибов, выбранные для работы.	113
Таблица 4. Линии дрожжей и растений, используемые в данной работе.	115
Таблица 5. Праймеры для секвенирования, генотипирования и ПЦР в реальном времени, использованные в данной работе.	122
Таблица 6. Плазмиды, использованные в данной работе.	125
Благодарности	131
Список литературы	132



## Список сокращений

- 2-PS – пиронсинтаза
- 4CL – 4-кумароил-КоА-лигаза
- АСС – ацетил-КоА-карбоксилаза
- АМР – аденозинмонофосфат
- ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия
- ДАГФ – 3-дезоксид-Д-арабино-гептулозонат-7-фосфат
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИЮПАК – международный союз теоретической и прикладной химии (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC)
- кДНК – комплементарная ДНК
- КоА – кофермент-А
- НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- ПКС – поликетидсинтаза
- ПЦР – полимеразной цепной реакции
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СЖК – синтазы жирных кислот
- т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов
- УФ – ультрафиолет
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЯМР-спектроскопии – спектроскопия ядерного магнитного резонанса
- AAE13 – малонил-КоА-синтетаза из *Arabidopsis thaliana*
- AbYPKS – ПКС типа III из *Atropa belladonna*
- АСР – ацилпереносающий белок
- ACS – акридонсинтаза
- АСТ – ген белка домашнего хозяйства актина *Nicotiana benthamiana* (AY594294)
- ACT1 – ген белка домашнего хозяйства актина *Pichia pastoris*
- ADS – алкилдикетид-КоА-синтаза
- ALS – алеозонсинтаза
- AMP – AMP-связывающий домен
- amiRNA - искусственные микроРНК (artificial microRNA)

AN8566 – протокатехоат-3,4-диоксигеназа

ANR – антоцианинредуктаза

ANS – антоцианинсинтаза

AQS – алкилхинолонсинтаза

aroG<sup>fbr</sup> – мутант ДАГФ-синтазы aroG D146N, устойчивый к регуляции по механизму отрицательной обратной связи

AT – ацилтрансферазный домен

BACE1 – фермент, расщепляющий белок-предшественник  $\beta$ -сайта амилоида

BAS – бензацетонсинтаза

Bax / Bcl-2 белки – белки регуляторы апоптоза

BBS – бибензилсинтаза

bHLH – транскрипционный фактор, имеющий мотив «спираль-поворот-спираль»

BIS – бифенилсинтаза

BphA – бензоат-4-монооксигеназа

BPS – бензафенонсинтаза

BY-2 – суспензионная культура клеток *Nicotiana tabacum Bright Yellow-2*

C3'H – п-кумароилшикимат-3'-гидроксилаза

C3H – кумарат-3-гидроксилаза

C4H – циннамат-4-гидроксилаза

cgPKS – поликетидсинтаза из гриба *Cortinarius glaucopus*

CHI – халконизомераза

CHIL – белок, подобный халконизомеразе

CHS – халконсинтаза

COMT O – метилтрансфераза кофейной кислоты

CPH – каффеоилпируватгидролаза *Neonothopanus nambi*

CRISPR-активация – активация экспрессии с помощью системы CRISPR/dCas, основанной на инактивированной нуклеазе Cas9

CSE – каффеоилшикиматэстераза

CTAS – синтаза п-кумароилтриуксусной кислоты

CURS – куркуминсинтаза

CYP53A15 – ортолог BphA, катализирующий трансформацию гидроксибензойной кислоты в протокатеховую кислоту

dCas9 – инактивированная нуклеаза Cas9

DCS – дикетид-КоА-синтаза

DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза  
 DH – дегидратазный домен  
 DKS – дикетидсинтаза  
 DMID – 7,2'-дигидрокси-4'-метоксиизофлавонолдегидратаза  
 DTT – дитиотреитол  
 EGFP – зеленый флуоресцентный белок  
 ER – еноилредуктазный домен  
 F3'5'H – флавоноид-3',5'-гидроксилаза  
 F3'H – флавоноид-3'-гидроксилаза  
 F3H – флаванон-3-гидроксилаза  
 FAS – синтаза жирных кислот  
 FFLuc – люцифераза светлячка *Photinus pyralis*  
 FLS – флавонолсинтаза  
 FNS – флавоносинтаза  
 FoxA – циннамоил-КоА-гидратаза/дегидрогеназа  
 gcPKS – поликетидсинтаза из гриба *Gymnopilus chrysopellus*  
 H1N1, H3N2 и H5N1 – вирусы гриппа  
 HcsA – гидроксицинномат-КоА-синтаза  
 HCD - высокоэнергетичная столкновительная диссоциация (Higher-energy collisional dissociation)  
 HCT – гидроксициннамоил-КоА-шикимат/хинат-гидроксициннамоилтрансфераза  
 HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота  
 HpaB - один из белков гетеродимерной циннамат-3-гидроксилазы  
 HpaC - один из белков гетеродимерной циннамат-3-гидроксилазы  
 hsPKS – поликетидсинтаза из гриба *Hypholoma sublateritium*  
 HsPKS4 – PKS типа III из *Huperzia serrata*  
 I2'H – изофлавоноид-2'-гидроксилаза  
 IFR – изофлавоноидредуктаза  
 IFS – изофлавоносинтаза  
 INTB – стратегия итеративной высокопроизводительной балансировки (iterative high-throughput balancing)  
 IOMT – изофлавоноид-О-метидтрансфераза  
 KatA – 3-кетацил-КоА-тиолаза  
 KR – кеторедуктазный домен

KS – кетосинтазный домен

LAR – лейкоантоцианидинредуктаза

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

matB – малонил-KoA-синтетаза из *Arabidopsis thaliana*

matC – белок носитель малоната

mcitHispS – гиспидинсинтаза из *Mycena citricolor*

MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота

MG132 – специфичный обратимый пептидный ингибитор протеасомы,

N-(бензилоксикарбонил)лейциниллейциниллейциналь)

MMA буфер – 10 mM MES, pH 5.7, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ ацетосирингон

MoClo – модульное клонирование

MS среда – Murashige Skoog среда

MT – метилтрансферазный домен

MYB – транскрипционный фактор

NanoLuc – коммерческое название искусственно оптимизированной люциферазы

*Oplophorus gracilirostris*

NF-κB – транскрипционный фактор

nnH3H – гиспидин-3-гидроксилаза *Neonothopanus nambi*

nnHispS – гиспидинсинтаза *Neonothopanus nambi*

nnLuz – люцифераза *Neonothopanus nambi*

NpgA – фосфопантетеин-трансфераза из *Aspergillus nidulans*

NRPS – нерибосомная пептидсинтетаза

NRPS-PKS – гибридный фермент, состоящий из доменов нерибосомной пептидсинтетазы и полкетидсинтазы

NS — незначимо

ObhA1 – декарбоксилаза коричной кислоты

OD – единица оптической плотности

OKS – октакетидсинтаза

OLS – оливетолсинтаза

ORS – 2'-оксоалкилрезорцинсинтаза

Pad – декарбоксилаза фенольной кислоты

PAK1 – серин/треонинпротеинкиназа 1

PAL – фенилаланинаммонийлиаза

PBS – фосфатный буфер

pCMV – промотор цитомегаловируса  
 pCmYLCV – промотора вируса желтого скручивания листьев цеструма  
 PCS – пентакетидхромонсинтаза  
 pGAP – промотор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы  
 PKS – поликетидсинтаза  
 PKSA и PKSB– ПКС, специфичные для пыльников  
 PmSPS1 и PmSPS2 – стильбенсинтазы перца опьяняющего *Piper methysticum*  
 PrASCL – поликетидсинтаза из *Physcomitrella patens*  
 PPi – пирофосфат  
 ppsA – фосфоенолпируватсинтаза  
 PPT-аза – фосфопантетеин-трансфераза  
 QNS – хинолонсинтаза  
 RLuc – люцифераза *Renilla luciferase*  
 RT – рамнозилтрансфераза  
 RT-ПЦР – ПЦР в реальном времени  
 ScAcc – ацетил-КоА-карбоксилаза из *Saccharomyces cerevisiae*  
 SeACS – ацетил-КоА-синтаза из *Salmonella enterica*  
 SIMYB75 – регуляторный транскрипционный фактор MYB *Sesamum indicum*  
 Snf1p – неферментирующий сахарозу белок 1  
 SOB – super optimal broth, среда для культивирования бактерий  
 STCS – стильбенкарбоксилатсинтаза  
 STS – стильбенсинтаза  
 TAE-буфер – трис-ацетатный буфер  
 TAL – тирозинаммонийлиаза  
 tAOX – терминатор алкогольоксидазы  
 TE – тиюэстеразный домен  
 TheA/B/C/D – тиюэстеразы (TheA-D; NRRL3\_00621, NRRL3\_01539, NRRL3\_02735 and NRRL3\_06009)  
 tktA – транскетолаза  
 tNOS – терминатор нопалинсинтазы из *Agrobacterium tumefaciens*  
 tyrA<sup>fbr</sup> – мутант хоризматмутаза/префенатдегидрогеназы tyrA M53I, A354V, устойчивый к регуляции по механизму отрицательной обратной связи  
 tyrR – фактор транскрипции, репрессирующий гены пути биосинтеза тирозина  
 UFGT – UDPG-флавоноидгликозилтрансфераза

VPS – валерофенонсинтаза

VR – веститонредуктаза

WT – дикий тип

YPD – среда для культивирования дрожжей, состоящая из 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы, агара

## Введение

Поликетид гиспидин относится к группе стирилпиронов – фенольных соединений, обладающих высокой биологической активностью. Гиспидин впервые обнаружен у *Polyporus hispidus* в 1961 году (Edwards и др., 1961), и его структура подтверждена полным синтезом (Edwards и Wilson, 1961). Впоследствии поликетид описан у различных родственных видов грибов семейства *Hymenochaetaceae* (род *Inonotus* (*I. hispidus*, *I. obliquus*, *I. xeranticus*), *Phellinus* (*P. linteus*, *P. ignarius*, *P. baumii*, *P. harmala*, *P. sensu lato*)) и австралийского гриба *Cortinarius sp.* (Watling и др., 1992). Также гиспидин и его производные встречаются в качестве метаболитов во многих растениях, например, в хвоще *Equisetum arvense*, в сложноцветном растении *Achyrocline bogotensis* (Tian и др., 2017), фисташке *Pistacia atlantica* (Yousfi и др., 2009) и т.д.

Ферменты биосинтеза гиспидина – поликетидсинтазы, представляют собой разнообразную группу белков, обладающую значительным биоинженерным потенциалом. Они могут производить широкий спектр продуктов важных для промышленности, сельского хозяйства и медицины. Несмотря на то, что и поликетиды, и поликетидсинтазы изучаются более полувека, на сегодняшний день предсказание субстратного предпочтения, получаемого продукта и рационализация процесса биосинтеза далеки от полного понимания. Перенос метаболических путей синтеза поликетидов в гетерологические системы часто приводит к невысокому выходу целевого продукта. Подобные ограничения свидетельствуют о недостатке знаний в данной области.

Поликетид гиспидин – предшественник люциферина высших грибов и играет важную роль в процессе биолюминесценции (Kotlobay и др., 2018; Purtov и др., 2015). Таким образом, изучение биосинтеза гиспидина в контексте биолюминесцентной реакции позволит расширить применение этой системы в качестве репортера, а также усовершенствовать имеющиеся знания о поликетидсинтазах и их продуктах.

## Актуальность темы исследования

На сегодняшний день методы биоимаджинга, основанные на флуоресценции и биолюминесценции находят широкое применение в науке и медицине. Расшифровка механизма биолюминесценции высших грибов позволила получить в распоряжение исследователей еще один потенциальный инструмент для разработки новых методов

визуализации на его основе. Однако для эффективного использования этой системы необходимо провести более детальные исследования: изучить ограничения ее применения в различных гетерологических хозяевах, определить и оптимизировать ключевые этапы биолюминесцентного каскада, изучить взаимодействие с различными субстратами и провести сравнение с уже описанными люциферин-люциферазными реакциями, что и было сделано в данной работе.

Изучение биосинтеза гиспицина неотрывно связано с исследованием поликетидсинтаз – основных ферментов, участвующих в его производстве. Поликетидсинтазы изучаются уже давно, и их использование для биосинтеза природных биологически активных соединений имеет важное значение в промышленности, сельском хозяйстве, фармакологии и других областях. Несмотря на это, отсутствие необходимых знаний затрудняет рациональный подход к планированию биосинтеза и увеличению продукции целевых соединений. Оптимизация процесса биосинтеза гиспицина позволит не только расширить наше понимание поликетидсинтаз грибов и растений, но и в дальнейшем позволит подробнее изучить свойства этого поликетиды с точки зрения медицины и фармакологии.

### **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 оксилюциферина, 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 (Mitiochkina и др. 2020; Khakhar и др. 2020). В 2024 биолюминесцентная система на основе ферментов из *N. nambi* была усовершенствована: подобрана гиспидинсинтаза из *Mycena 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 исследования**

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 значимость 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 – поликетидсинтаз и 4-кумароил-КоА-лигаз. Некоторые ферменты из растений были описаны в исследованиях ранее, как синтезирующие  $\alpha$ -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 поликетидсинтаз 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 поликетидсинтаз – 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 поликетидсинтаз, но других ферментов биолюминесцентной системы (Kaskova

и др., 2017; Purto и др., 2015), и в дальнейшем открывает возможность разработки многоцветной автономной биолюминесценции.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Биолюминесцентный каскад, включающий nnHisps, NpgA, nnLuz, nnH3H из гриба *N.nambi*, функционирует при добавлении не только кофейной, но и кумаровой или феруловой кислот в клетках дрожжей;
2. Поликетидсинтаза hsPKS из небиолюминесцентного гриба *Hypholoma sublateritium*, обеспечивает на модели клеток дрожжей биолюминесценцию совместно с ферментами NpgA, nnLuz, nnH3H при добавлении кофейной, кумаровой и феруловой кислот;
3. Гибридный биолюминесцентный каскад, состоящий из поликетидсинтаз III типа и 4-кумароил-КоА-лигаз растений, а также ферментов nnLuz и nnH3H, активен при добавлении кофейной кислоты в клетках дрожжей и млекопитающих;
4. Поликетидсинтазы III типа из разных растений совместно с 4-кумароил-КоА-лигазой осуществляют биосинтез гиспидина из кофейной кислоты в клетках дрожжей;
5. Ткани и клетки растений *Nicotiana*, экспрессирующие гены поликетидсинтаз III типа из растений, а также гены ферментов nnLuz, nnH3H и nnCPH, демонстрируют автономную биолюминесценцию;
6. Реакция, катализируемая поликетидсинтазой III типа, является лимитирующей в автономно биолюминесцентных стабильных линиях *N.benthamiana*, которые экспрессируют гены ферментов PpASCL, nnH3H, nnLuz, nnCPH.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность и воспроизводимость полученных результатов обеспечена современными методами исследований, налаженными в нашей лаборатории, публикациями в рецензируемых научных журналах и 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.).

## Глава 1. Обзор литературы

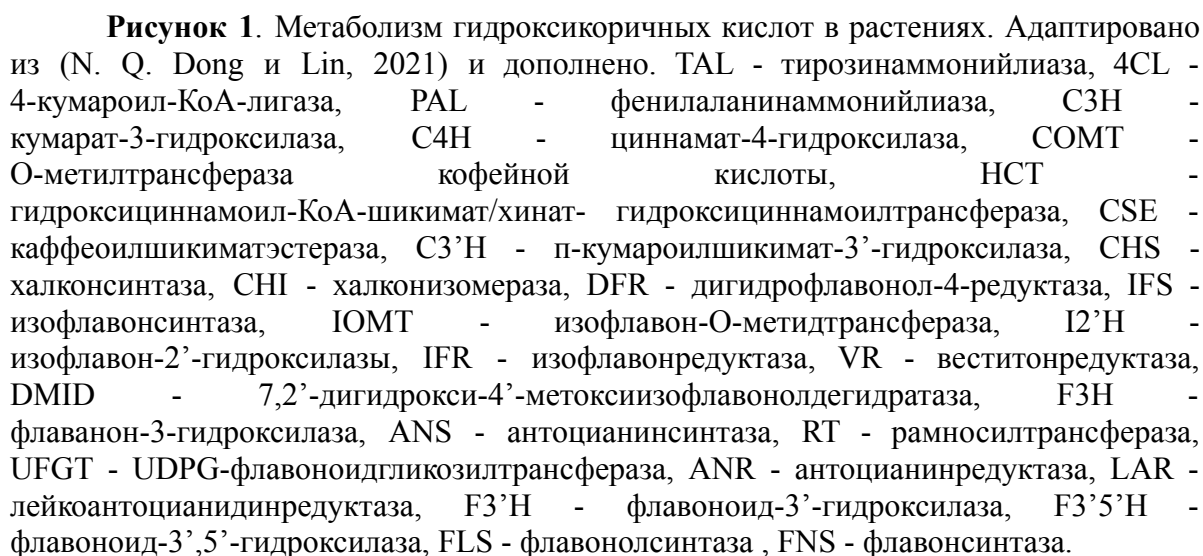
### 1.1. Биологическая роль гидроксикоричных кислот в растениях и грибах

#### 1.1.1. Метаболизм гидроксикоричных кислот в растениях

В ходе эволюции для приспособления к наземному образу жизни и неблагоприятным экологическим и абиотическим факторам внешней среды, растения развили сложные механизмы биосинтеза вторичных метаболитов. К таким соединениям относятся фенилпропаноиды, которые позволили осуществить наземную адаптацию за счет разветвленных путей, дающих начало метаболитам, включая лигнин, флавоноиды, лигнаны, сложные эфиры фенилпропаноидов, амиды гидроксикоричной кислоты и спорополленин. Эти соединения играют важную роль в жизни растения, обеспечивая механическую поддержку и защиту, реакцию на стрессовые факторы, участие в транспорте воды и питательных веществ, а также привлечение насекомых для опыления и распространение семян (Sharma и др., 2019; Shomali и др., 2022).

Предшественниками лигнолов, флавоноидов, стильбенов и многих других важных растительных метаболитов являются ароматические гидроксикоричные кислоты. Они присутствуют в растениях как в свободной форме, так и в связанном с полисахаридами клеточной стенки состоянии, а также образуют поперечные сшивки между ними. Ароматические кислоты обеспечивают прочность клеточной стенки, а кроме того, они и их производные обладают антимикробным и противогрибковым действием, защищая органы и ткани растения от влияния патогенов и ультрафиолета (El-Seedi и др., 2018; Loffredo и Traversa, 2014; Neelam и др., 2020). Часто гидроксикоричные кислоты присутствуют в растениях в виде сложных эфиров, например, с хинной кислотой, а также гликозилированных производных.

Фенольные кислоты синтезируются в растениях из фенилаланина и тирозина, которые в свою очередь являются продуктами шикиматного пути. Шикиматный путь представляет собой семь последовательных реакций превращения фосфоенолпирувата и D-эритрозо-4-фосфата – промежуточных продуктов гликолиза и пентозофосфатного пути – соответственно, в шикимат и затем в хоризмат – предшественник тирозина и фенилаланина (рис.1). Шикиматный путь консервативен и описан для бактерий, грибов, растений, а также некоторых простейших, но отсутствует у животных.



Далее полученные аминокислоты вовлекаются в фенилпропаноидный путь, разветвляющийся на биосинтез флавоноидов, эфиров и амидов гидроксикоричной

кислоты, а также предшественников лигнина, лигнанов и танинов. Фенилпропаноидный путь начинается реакцией, катализируемой фенилаланин-аммоний-лиазой (PAL) с образованием из фенилаланина коричной кислоты (рис.1). За этим следует последовательное превращение гидроксикоричных кислот: кумаровой, кофейной, феруловой и т.д. в ходе реакций, катализируемых циннамат-4-гидроксилазой (C4H), кумарат-3-гидроксилазой (C3H), О-метилтрансферазой кофейной кислоты (COMT) и образование их КоА-тиоэфиров, катализируемое 4-кумароил-КоА-лигазой (4CL). Тиоэфиры гидроксикоричных кислот затем вовлекаются в разные метаболические ветви. Ветвь фенилпропаноидного пути, приводящая к биосинтезу лигнина, регулируется гидроксициннамоил-КоА-шикимат/хинат-гидроксициннамоилтрансферазой (HCT). Этот фермент катализирует 2 реакции пути с образованием кафеоил-КоА и определяет метаболический поток к синтезу монолигнолов (Hoffmann и др., 2004).

Биосинтез флавоноидов приводит к пигментам, определяющим окраску цветов: антоцианам, флавонам и флавонолам, регуляторам транспорта ауксинов – агликон-флавонолам, соединениям в составе клеточной стенки пыльцы, антиоксидантам. Первая реакция в этом процессе – превращение халкона в кумароил-КоА катализируется халконсинтазой (CHS) (рис.1). Данный фермент относится к поликетидсинтазам III типа, которые представляют большой интерес для биотехнологии в связи с широкой субстратной специфичностью и способностью образовывать поликетиды разных структур. Стоит отметить, что способность взаимодействовать с несколькими схожими по структуре субстратами отмечена для 4CL и ряда других ферментов фенилпропаноидного пути (N. Q. Dong и Lin, 2021), что может играть важную роль в регуляции и перенаправлении метаболических путей.

Регуляция фенилпропаноидного пути в растениях находится в тесной связи с меняющимися факторами внешней среды и происходит на уровне транскрипции, посттрансляционно, а также за счет сигнальных путей фитогормонов. Регуляция транскрипции с помощью транскрипционных факторов MYB, комплекса MBW (R2R3-MYB, bHLH, WD40), ряда дополнительных транскрипционных факторов, а также микроРНК, которые реагируют на накопление промежуточных продуктов пути, играет ключевую роль в регуляции биосинтеза флавоноидов (Naik и др., 2022; S. Zhang и др., 2021). Посттрансляционная регуляция описана для протеасомной системы убиквитин-26S, которая нацелена на узловые ферменты метаболических ветвей – PAL, CHS, приводя к их деградации (J. I. Kim и др., 2020; X. Zhang и др.,

2017). Также была описана регуляция субстратной специфичности продукта CHS с помощью белков, подобных халконизомеразе (CHIL), в присутствии которых удавалось регулировать поток субстрата флавоноидного пути (Waki и др., 2020). Фитогормоны, такие как ауксины, этилен, жасмонат, гиббереллины, также участвуют в регуляции метаболизма фенилпропаноидов в основном влияя посредством сигнальных путей на транскрипционные факторы (N. Q. Dong и Lin, 2021).

Фенилпропаноидный путь является одним из наиболее изученных в растениях, описаны ферменты, катализирующие основные стадии в регуляции биосинтеза флавоноидов. Это позволило с помощью метаболической инженерии получить растения с измененным составом и содержанием лигнина, которые применяются в бумажной промышленности, а также в качестве кормовых культур (Halpin, 2019). Кроме того, удалось вывести растения ипомеи с желтой окраской лепестков за счет совместной экспрессии дополнительных ферментов: ауреусидинсинтазы и халкон-4'-О-гликозитрансферазы и подавления халконизомеразы (Hoshino и др., 2019). Также, путем повышенной экспрессии регуляторных факторов транскрипции антоцианов львиного зева (Butelli и др., 2008) или гена SIMYB75 томата (Jian и др., 2019), получилось добиться накопления антоцианов в плодах томатов. Однако гетерологическая экспрессия данного пути или его фрагментов не всегда приводит к такому же спектру продуктов, как в исходном растении, что свидетельствует о необходимости исследовать данный каскад, его стадии, ферменты участвующие в превращениях, а кроме того, взаимосвязь с другими метаболическими путями растений.

### **1.1.2. Метаболизм гидроксикоричных кислот в грибах**

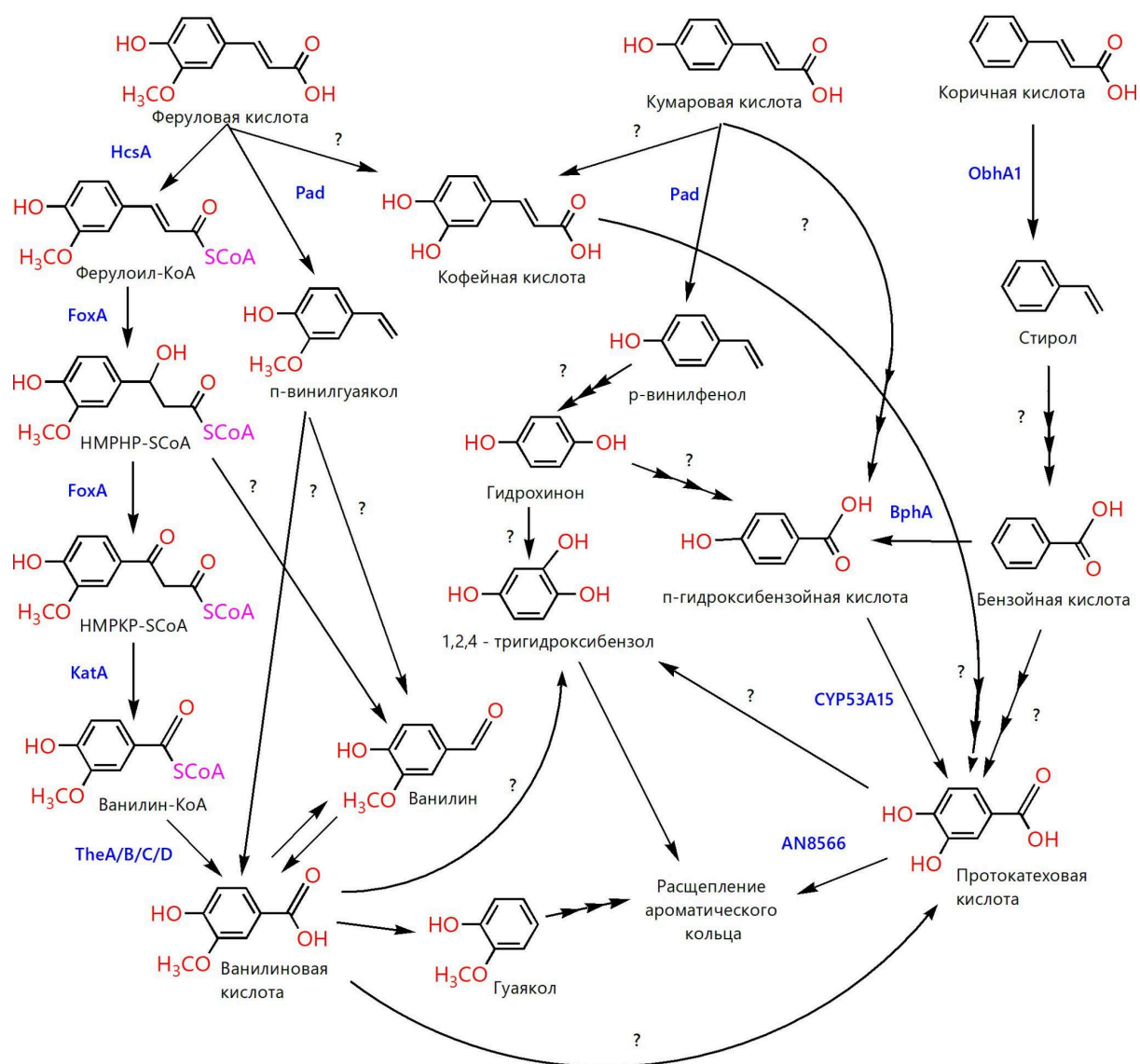
Деградация растительной биомассы, вызванная активностью бактерий и грибов, приводит к высвобождению гидроксикислот из связанной формы и подавлению даже в небольших концентрациях их роста. Для приспособления к этому в ходе эволюции у бактерий и грибов появились пути внутриклеточного преобразования ароматических соединений в менее токсичные продукты и источники углерода. Для разных видов грибов и микроорганизмов описан различный метаболизм ароматических кислот и устойчивость к разному набору растительных соединений. Предполагают, что ключевой вклад в выбранную стратегию оказывает среда обитания, доступность субстрата и наличие кофакторов. Кроме того, у многих видов описано



несколько метаболических путей для преобразования одного ароматического соединения (Mäkelä и др., 2015).

В отличие от бактерий, для которых проведено большое количество исследований, для грибов метаболические пути и ферменты, участвующие в них, описаны гораздо хуже. Согласно опубликованным на данный момент работам, существуют биохимические реакции, общие для бактерий и грибов, такие как, например, утилизация феруловой кислоты в ванилин или ванилиновую кислоту, трансформирующиеся затем в протокатеховый альдегид, или гваякол, или 1,2,4-тригидроксibenзол с последующей деградацией ароматического кольца (рис.2) (Lubbers и др., 2019). Наиболее полно охарактеризовано КоА-зависимое окисление феруловой кислоты для *Aspergillus niger* до ванильной кислоты в пять этапов (рис.2). Любопытно, что некоторые из описанных ферментов пути окисления феруловой кислоты участвуют также в окислении жирных кислот и, предположительно, локализуются в пероксисомах (Lubbers и др., 2021). Кроме того, в грибах было описано превращение феруловой кислоты путем неокислительного декарбоксилирования, хотя среди ферментов описана только декарбоксилаза фенольной кислоты (Pad) из *Aspergillus luchuensis* (M. Maeda и др., 2018) и из *Isaria farinosa* (Linke и др., 2017). Данный фермент также участвует и в катаболизме кумаровой кислоты, катализирует ее превращение в п-винилфенол, который в ходе последующих реакций с образованием гидрохинона и/или 1,2,4-тригидроксibenзола подвергается расщеплению ароматического кольца.

Некоторые пути уникальны для грибов, например, декарбоксилирование коричной кислоты в стирол, которое не наблюдалось для бактерий. Стирол затем трансформируется в бензойную кислоту и через протокатеховую кислоту претерпевает деградацию ароматической части. Для кумаровой кислоты описана трансформация в кофейную или п-гидроксibenзойную кислоту, однако ферменты, катализирующие это превращение в грибах, на данный момент не описаны. При этом у дрожжей превращение п-кумаровой кислоты в п-гидроксibenзойную кислоту не наблюдалось (Lubbers и др., 2019).



**Рисунок 2.** Катаболизм феноловых кислот (феруловой, кофейной, коричной и кумаровой) в грибах. Адаптировано из (Arentshorst и др., 2022; Lubbers и др., 2019). HcsA - гидроксицинномат-КоА-синтаза, FoxA - циннамоил-КоА-гидратаза/дегидрогеназа, KatA - 3-кетоацил-КоА-тиолаза, TheA/B/C/D - тиоэстеразы (TheA-D; NRRL3\_00621, NRRL3\_01539, NRRL3\_02735 and NRRL3\_06009), Pad - декарбоксилаза феноловой кислоты, ObhA1 - декарбоксилаза коричной кислоты, BphA - бензоат-4-монооксигеназа, CYP53A15 - ортолог BphA, катализирующий трансформацию гидроксибензойной кислоты в протокатеховую кислоту, AN8566 - протокатехоат-3,4-диоксигеназа.

Помимо процессов катаболической деградации ароматических гидроксикоричных кислот, существуют пути, которые приводят к биосинтезу природных вторичных метаболитов. Для грибов было описано разнообразие поликетидов (Bai и др., 2023; I.-K. Lee и Yun, 2011), однако механизмы их биосинтеза изучены не так подробно. Были описаны гибридные ферменты нерибосомных

пептидсинтетаз (NRPS) и поликетидсинтазы (ПКС) грибов, которые приводят к биосинтезу нарингенина из кумаровой кислоты в качестве субстрата. Это также может являться одним из способов приспособления к сложным природным условиям существования (H. Zhang и др., 2022). Кроме того, в *Aspergillus oryzae* описан ген CHS и CHS-подобные гены у родственных грибов, относящиеся к ПКС III типа, отличающимся филогенетически от ферментов растений (Furumura и др., 2023; Rao и др., 2005).

Метаболические пути грибов еще во многом предстоит исследовать для поиска новых ферментов, способных стать удобными мишенями для генной инженерии.

## 1.2. Ферменты биосинтеза гиспидина – поликетидсинтазы

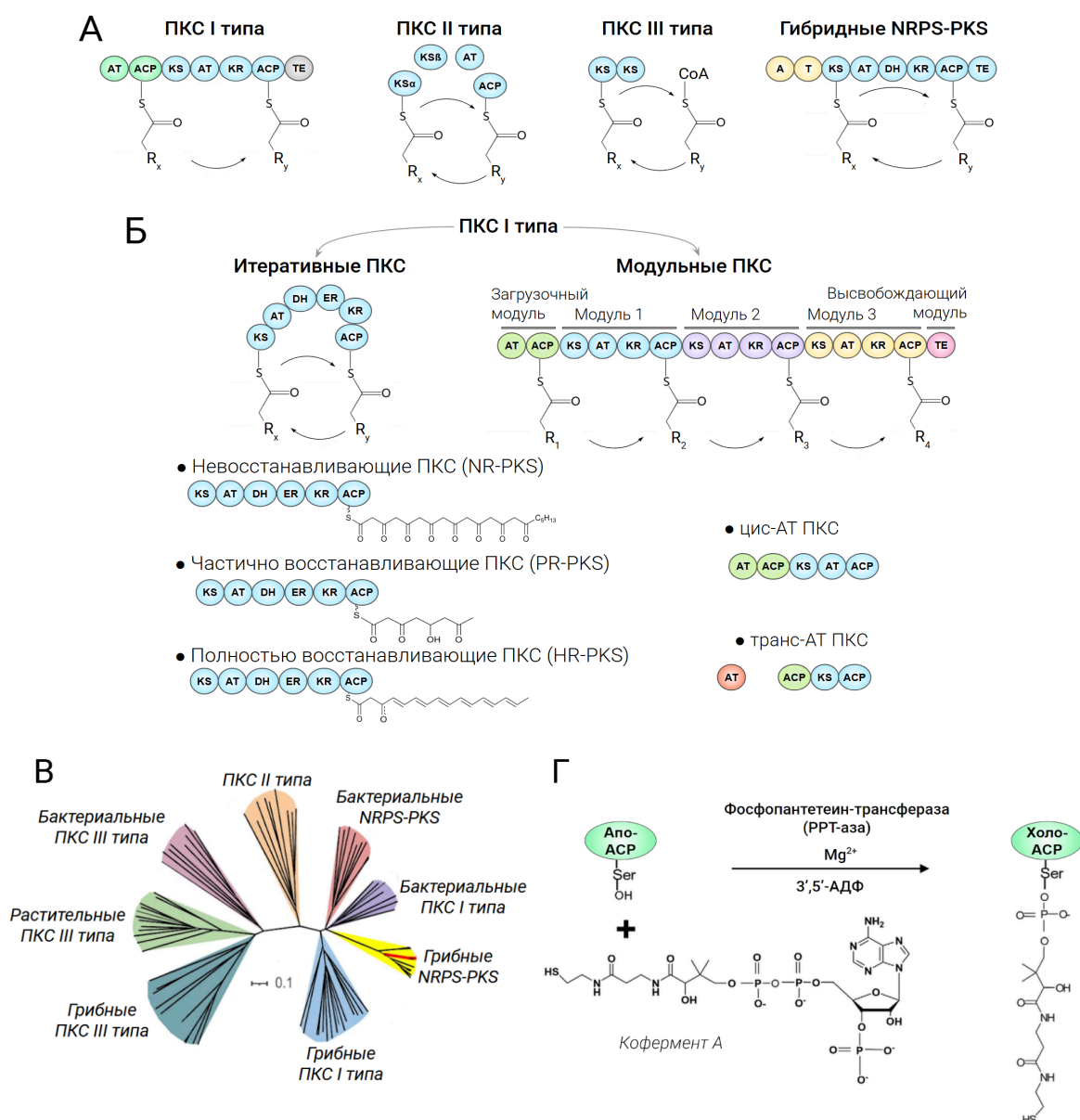
Поликетидсинтазы (ПКС) – основные ферментные системы растений, бактерий и грибов, участвующие в биосинтезе поликетидов с разнообразными структурами и биологической активностью. Согласно определению ИЮПАК, к поликетидам относят природные соединения, содержащие чередующиеся карбонильные и метиленовые группы, образованные в результате многократных этапов конденсации ацетил-КоА (через малонил-КоА), а также соединения, полученные из них путем дальнейшей конденсации (Moss и др., 1995). Помимо важных биологических свойств: защиты от стрессовых факторов (Dao и др., 2011; Zeng и др., 2012), синтеза спорополенина (S. S. Kim и др., 2010), участия в регуляции социального поведения у амёб (Saito и др., 2008), – среди продуктов ПКС отмечают соединения, обладающие сельскохозяйственным и фармакологическим значением: рапамицин (S. R. Park и др., 2010), ресвератрол (Kulkarni и Cantó, 2015), ловастатин (S. M. Ma и Tang, 2007), даунорубицин (Vasanthakumar и др., 2013) и вещества, обладающие антибиотической активностью: тетрациклин (Lešnik и др., 2009), эритромицин (Rawlings, 2001) и многие другие.

Биосинтез поликетидов происходит путем серии последовательных трансформаций субстрата с присоединением простых строительных блоков, в качестве донора которых используются молекулы малонил-КоА. В состав ПКС входят несколько основных доменов: ацилтрансферазный (АТ), ацилпереносящий белок (АСР), кетосинтазный (КС). АТ-домен отвечает за загрузку главным и вспомогательным субстратами АСР-домена, который переносит эти субстраты далее на КС-домен. АСР-домен для нормальной работы должен быть модифицирован по

консервативному остатку серина с помощью кофактора фосфопантетеина, полученного из кофермента А. Эту реакцию катализирует фермент фосфопантетеин-трансфераза (PPT-аза) (Beld и др., 2014) (рис.3 Г). KS-домен консервативен и катализирует образование углерод-углеродной связи по механизму тиоэфирной конденсации Кляйзена (Naaralainen и др., 2006). Кроме того, ПКС может содержать дополнительные домены, выполняющие ряд модификаций: кеторедуктазный (KR), дегидратазный (DH), еноилредуктазный (ER), метилтрансферазный (MT) и т.д. Домены KR, DH, ER последовательно восстанавливают промежуточный продукт до  $\beta$ -гидроксильной, алкеновой и метиленовой функциональных групп, соответственно. Эти домены могут как входить в состав модуля, так и присутствовать в виде автономных белков. Заключительный домен на пути биосинтеза поликетидов – тиоэстеразный (TE), катализирующий высвобождение продукта ПКС путем гидролиза или циклизации (Weissman, 2016). У бактерий гены ферментов биосинтеза поликетидов и гены ферментов, дополнительно модифицирующих конечный продукт, часто образуют кластер (Y. Wei и др., 2018).

На основании доменной структуры ПКС подразделяют на следующие типы (рис.3 А): I, II, III и гибридные (Staunton и Weissman, 2001). ПКС I типа представляют собой крупные мультидоменные белки, которые обнаружены у бактерий и грибов. ПКС I типа подразделяют на итеративные и модульные ферменты (рис.3 Б). Итеративные ПКС выполняют несколько этапов увеличения цепи внутри одного функционального участка, часто встречаются у грибов, в то время как конвейерная структура модульных ферментов, где каждый раунд наращивания цепи выполняет следующий модуль, более характерна для бактерий. Кроме того, среди модульных ПКС выделяют *цис*-АТ и *транс*-АТ ферменты, отличающиеся положением АТ-домена: интегрированным или автономным, соответственно. В строении модульных ПКС выделяют 3 модуля: 1) стартовый, взаимодействующий с основным субстратом или стартером; 2) элонгационный, обладающий ферментативной активностью; 3) терминирующий, высвобождающий продукты реакции. Индивидуальные ПКС могут отличаться по составу и порядку доменов. Итеративные ПКС грибов можно дополнительно классифицировать на три группы: невосстанавливающие, частично восстанавливающие и полностью восстанавливающие (Cox, 2007). Невосстанавливающие ПКС производят ароматические поликетиды путем циклизации невосстановленных реакционноспособных поли- $\beta$ -кетоцепей в моно- и полициклические соединения. Полностью восстанавливающие производят большое

количество разнообразных линейных и циклических соединений. Частично восстанавливающие PKS грибов вводят гидроксильные группы в определенные участки растущей поликетидной цепи, закладывая тем самым структурную основу для последующей реакции циклизации. Согласно филогенетическим исследованиям, частично восстанавливающие PKS грибов произошли от бактериальных PKS путем горизонтального переноса генов.



**Рисунок 3.** А) Классификация поликетидсинтаз (адаптировано из (J. Lim и др., 2011; Y. P. Lim и др., 2016)). Б) Классификация поликетидсинтаз I типа. В) Филогенетический анализ KS-доменов поликетидсинтаз растений, бактерий и грибов адаптировано из (H. Zhang и др., 2022) (Масштаб 0.1 замены на сайт). Г) Реакция фосфопантетеинилирования домена ACP (адаптировано из (Naig и др., 2011)). Сокращение доменов: АТ - ацилтрансферазный, АСР - ацилпереносящий белок, КS - кетосинтазный, КR - кеторедуктазный, ДН - дегидратазный, ЕR - еноилредуктазный, ТЕ - тиоэстеразный.

Типичная ПКС II типа представляет собой мультиферментный комплекс, который состоит из отдельных диссоциированных белков (рис.3 А). Для этих ферментов характерно наличие АСР, так же, как и для ПКС I. Итеративные ПКС II типа распространены среди прокариотических актиномицетов и грамотрицательных бактерий (Brachmann и др., 2007). Доксорубицин, актинорходин, тетрациклин – типичные примеры продуктов биосинтеза ПКС II типа (Stewart и др., 2013).

ПКС III типа – гомодимеры, которые состоят из KS-доменов (рис.3 А). Структурно они гораздо проще устроены и не требуют для работы АСР. ПКС III типа способны выполнять серию реакций конденсации и циклизации с помощью одного активного центра, включающую консервативную каталитическую триаду Cys-His-Asn, отличающуюся от каталитической триад KS-доменов ПКС I и II типов – Cys-His-His. Различие между ПКС наблюдается в субстратах. В то время как ПКС других типов утилизируют клеточные метаболиты, а не КоА-производные, и самостоятельно производят АСР-тиоловые соединения с помощью стартового модуля и АТ-домена. Основным субстратом ПКС III типа может быть представлен как ароматическим КоА-тиоэффирами (кумароил-КоА, бензоил-КоА), так и линейными ацил-КоА производными (малонил-КоА, ацетоацетил-КоА). Вспомогательный субстрат, малонил-КоА, также заменен в некоторых случаях на метилмалонил-КоА, этилмалонил-КоА или ацетоацетил-КоА (Shimizu и др., 2017). Известно, что количество стадий конденсации, выполняемых в полости активного центра, может варьировать (Jez и др., 2001; Wanibuchi и др., 2011). ПКС III типа были описаны не только для растений, но также для бактерий и грибов, однако филогенетический анализ KS-домена относит их к отдельным группам ферментов (рис.3 В).

В грибах из поликетидов, объединенных с аминокислотами, синтезируется множество биологически активных соединений: циклопиазоновая кислота, фузарин С, теназоновая кислота, свейнсонин и др. (Fischbach M. A., Walsh C. T. 2006). Биосинтез таких соединений производят гибридные ферменты, состоящие из доменов NRPS и ПКС. Модуль NRPS включает конденсирующий, аденилирующий, тиолазный и восстанавливающий домены, однако не всегда все четыре домена входят в состав гибридных ферментов. ПКС, которые входят в состав гибрида, преимущественно представлены полностью восстанавливающими итеративными ПКС I типа. На сегодняшний день описано лишь несколько гибридных синтаз с невосстанавливающими ПКС.

Разнообразие продуктов ПКС является результатом эволюционного пути, который привел к появлению мультимодульной архитектуры и развитию дальнейшего многообразия структур ферментов. На сегодняшний день считается, что синтаза жирных кислот животных (FAS) имеет общего предка с ПКС I типа из грибов (Paiva и др., 2021). Несмотря на сильное отличие в продуктах биосинтеза FAS и ПКС, а также большое разнообразие поликетидов, домены, входящие в состав FAS и ПКС, гомологичны, хотя и функционируют по-разному (Nivina и др., 2019). NRPS образует отдельное семейство белков с отличными от ПКС доменами, однако стратегия биосинтеза схожа, модификация происходит одними и теми же PPT-азами, что позволяет предположить эволюционное родство этих ферментов (Shen и др., 2005; H. Wang и др., 2014), а объединение в гибридные ферменты облегчило передачу гибридных продуктов между отдельными модулями NRPS и ПКС.

Внимание к поликетидам и их биосинтезу высоко, т.к. они являются перспективными мишенями синтетической биологии. Функциональное разделение модулей ПКС на генетическом и биохимическом уровнях представляет потенциальную возможность для молекулярного моделирования и инженерии с целью создания новых поликетидов с заданными свойствами. На сегодняшний день уже были разработаны системы для биосинтеза соединений с терапевтическими свойствами (Wlodek и др., 2017), предшественников полимеров (Hagen и др., 2016), биотоплива (Yuzawa и др., 2018). Однако с увеличением числа охарактеризованных ПКС и ростом количества попыток создать гибридные ферментативные системы, становится понятно, что связь между структурой генов и конечным химическим продуктом не такая прямая и очевидная (Piel и др., 2010; Weissman и др., 2016). Простые замены домена между кластерами часто приводят к сбою биосинтеза, нарушению высвобождения продукта и/или его созревания (Y. Xu и др., 2013). Таким образом, многие закономерности работы поликетидсинтаз еще предстоит изучить.

### **1.2.1. Биосинтез гиспидина грибными ПКС**

Первые работы, посвященные исследованиям ПКС грибов, связаны с исследованиями поликетидов грибов: орселиновой и 6-метилсалициловой кислот Берчем и Донованом в 1950-60-х годах (Birch, 1967; Birch и Donovan, 1953). Позже схожесть биосинтеза поликетидов и жирных кислот нашла подтверждение в экспериментах с изотоп-меченым углеродом с помощью ЯМР-спектроскопии (Bentley и др., 1962). Участие малонил-КоА в биосинтезе поликетидов продемонстрировано с

помощью бесклеточных экстрактов грибов (Gatenbeck и Hermodsson, 1965). Синтаза 6-метилсалициловой кислоты из *Penicillium patulum* является первой ПКС, очищенной и охарактеризованной *in vitro* (Lynen и Tada, 1961). В 1990-е годы, благодаря развитию молекулярно-биологических инструментов преобладал акцент на исследовании бактериальных ПКС. Прогресс в изучении ПКС грибов происходил медленнее, тем не менее, сейчас мы лучше понимаем молекулярные основы и механизмы биосинтеза различных поликетидов (Chooi и Tang, 2012; Cox и Evitt, 2007). Исследована субклеточная компартментализация, считается, что ПКС грибов могут находиться в цитозоле, пероксисомах, вакуолях, везикулах и других мембраносвязанных органеллах (Skellam и др., 2022). При развитии знаний об энзимологии ПКС выяснилось, что взаимосвязь доменной организации ферментов и структуры синтезируемого продукта нелинейна. Кроме того, следует отметить, что некоторые признаки стоит обобщать только для малого подмножества тесно связанных эволюционно ферментов.

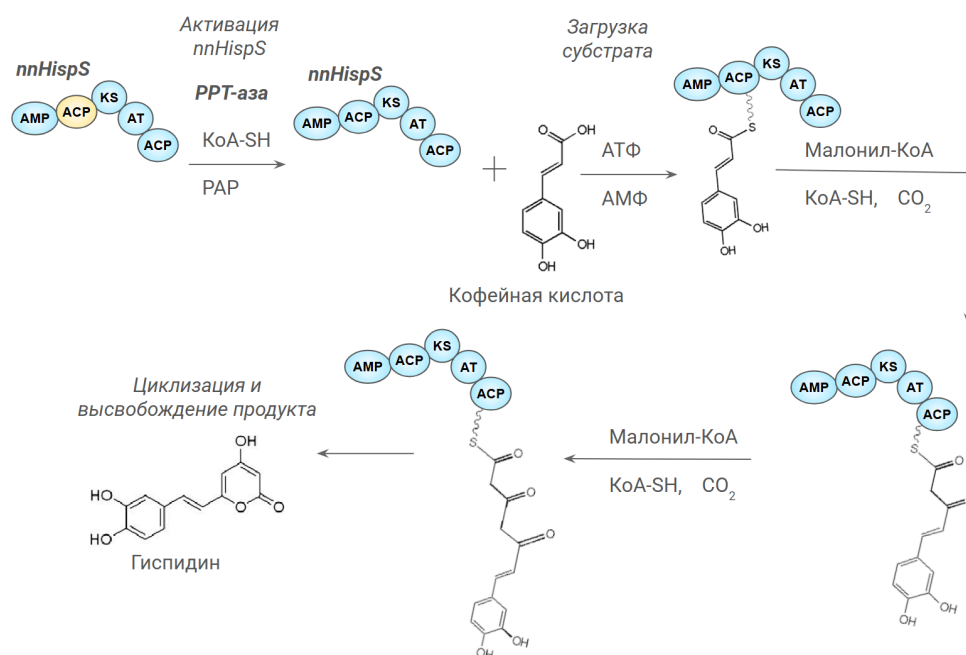
Исследование геномов родственных биolumинесцентных и небиolumинесцентных грибов отряда *Agaricales* из родов *Neonotopanus*, *Armillaria*, *Mycena*, *Panellus*, *Guyanagaster* и др. позволило обнаружить гены крупных поликетидсинтаз, в том числе, участвующих в биосинтезе гиспидина, предшественника люциферина грибов – nnHisps из *N.nambi* (Kotlobay и др., 2018) (рис.4). Хотя эти ферменты изучены слабо, nnHisps предположительно относится к группе гибридов NRPS и невосстанавливающих ПКС (Hai и др., 2020). Предсказано, что N-концевой блок NRPS состоит из AMP-связывающего домена, который принимает и активирует субстрат с последующим переносом его на тиол пантетеинового кофактора ACP. С-концевой модуль невосстанавливающей ПКС проводит реакцию биосинтеза  $\alpha$ -пирона с помощью доменов KS, AT, ACP. nnHisps выполняет два раунда удлинения цепи с использованием малонил-КоА как дополнительного субстрата. Образующееся при этом трикетидное промежуточное соединение самопроизвольно высвобождается посредством лактонизации, что приводит к образованию гиспидина. Фермент nnHisps описан недавно, мало изучен и представляет собой актуальный предмет исследования.

Другие ферменты, гены которых анализировали в работе (Kotlobay и др., 2018), имели разный доменный состав (рис.4). ПКС из люминесцентных грибов состояли из 5 доменов, в то время как ПКС несветящихся грибов имели дополнительные домены (7 и более) или редуцированный состав (менее 5 доменов). Это изменение архитектуры ПКС могло бы отражать изменение в характере катализируемой реакции



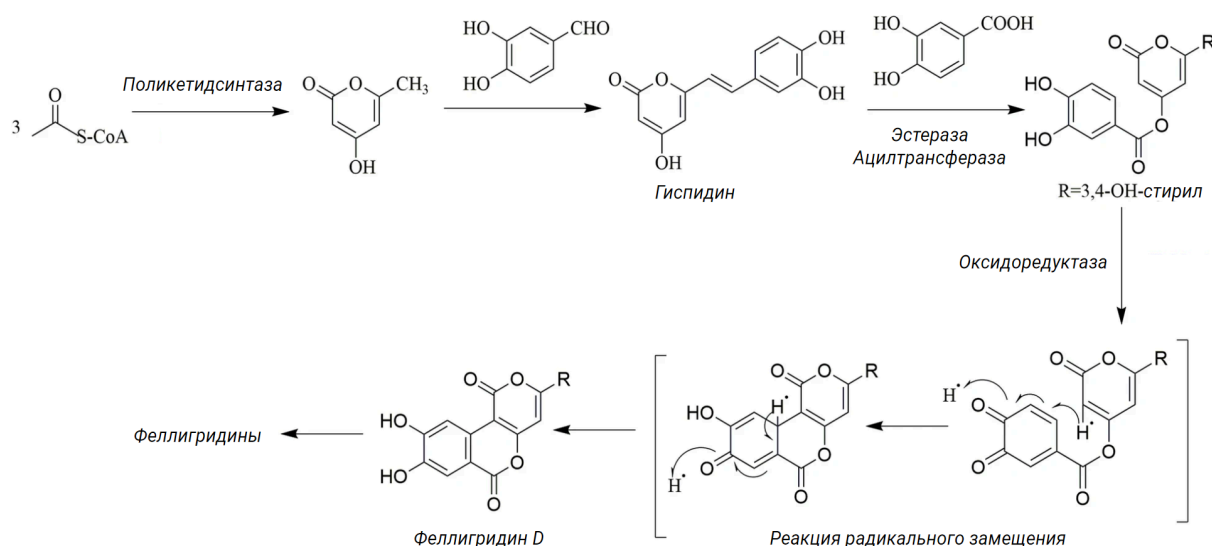
и, как следствие, синтезируемого продукта, а также стать эволюционным событием, которое привело к появлению генов ПКС, участвующих в каскаде биолуминесценции.

Недавно с помощью биоинформатических методов был найден ген гиспидинсинтазы ShPKS1 из *Sanghuangporus sanghuang*, а также подтверждено производство им гиспидина *in vivo* (J. Wei и др., 2023). Доменная структура была представлена 8 доменами AMP-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP-ACP, что близко к другим описанным ранее поликетидсинтазам грибов.



**Рисунок 4.** Адаптировано из (Palkina и др., 2023). Схема реакции биосинтеза гиспидина, катализируемая ПКС *N.nambi*. Сокращения доменов ПКС грибов: KS – кетосинтаза, АТ – ацилтрансфераза, АСР – ацилпереносящий белок, AMP – AMP-связывающий домен. PPT-аза - фосфопантетеин-трансфераза.

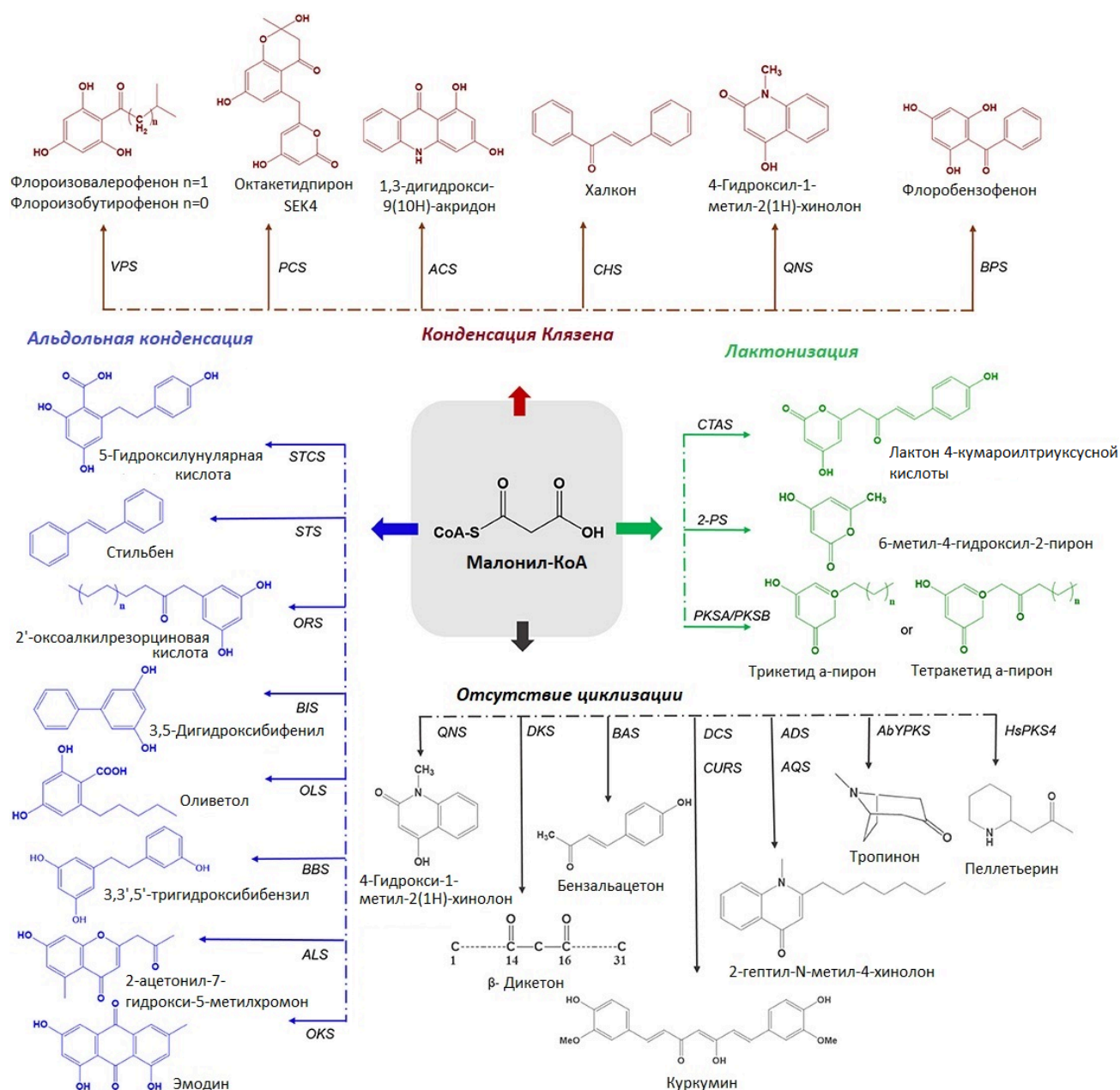
В работе, вышедшей несколько лет назад, описан биосинтез гиспидина по альтернативному пути, в котором гиспидин представлен как промежуточное соединение в биосинтезе феллигридинов гриба *Phellinus igniarius* (J. Guo и др., 2021) (рис.5). Согласно описанной стратегии, предшественником гиспидина и его производных являются трицетолактон и 3,4-дигидроксибензальдегид. В данной работе предсказаны белки, связанные с биосинтезом гиспидина и феллигридинов, считается, что они обладают поликетидсинтазной, оксидоредуктазной и дегидрогеназной активностями и их активация происходит в условиях стресса.



**Рисунок 5.** Адаптировано из (J. Guo и др., 2021). Биосинтез гиспидина и феллигридинов *Phellinus igniarius*.

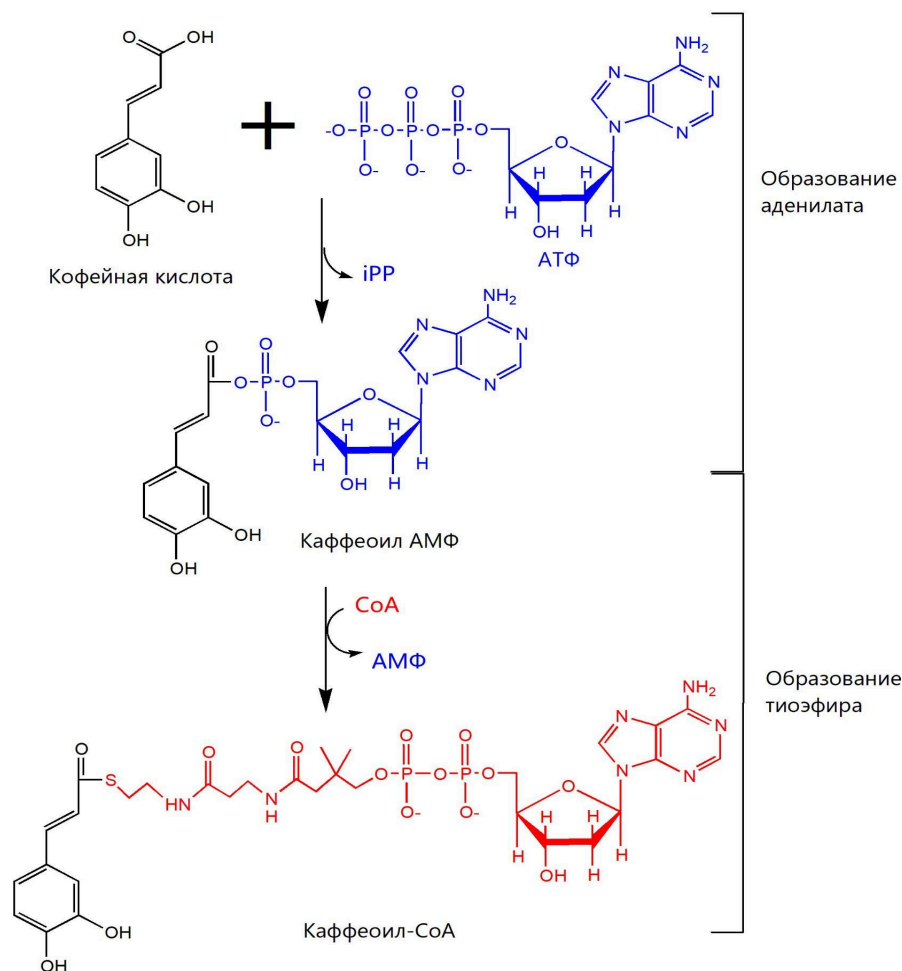
### 1.2.2. Биосинтез гиспидина и его аналогов в растениях с помощью ПКС III типа

Первые ПКС III типа были описаны только среди растений и исторически считались характерными для этой группы организмов. В 1983 году одной из первых была охарактеризована халконсинтаза петрушки *Petroselinum hortense*, участвующая в биосинтезе флавоноидов (Reimold и др., 1983). Позже ферменты, подобные халконсинтазам, найдены и среди грамположительных бактерий *Streptomyces griseus* (Funa и др., 1999), представителей грибов *Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* (Hashimoto и др., 2014), простейших *Amoebozoa*, клеточных слизевиков *Dictyostelium discoideum* (Austin и др., 2006), бурых водорослей *Ectocarpus siliculosus* (Meslet-Cladière и др., 2013). Среди ферментов растений наиболее исследована халконсинтаза люцерны посевной *Medicago sativa*, для которой получена кристаллическая структура и изучен механизм катализа (Ferrer и др., 1999). С изучением многообразия продуктов и механизмов катализируемых реакций растительными ПКС III типа растет и количество семейств ферментов, так, описаны стильбен-синтазы *Pinus sylvestris* (Austin и др., 2004), синтаза п-кумароилтриуксусной кислоты (CTAS) из *Hydrangea macrophylla* (Akiyama и др., 1999), бензальацетонсинтаза из *Rheum palmatum* (Abe и др., 2001), куркуминсинтаза из *Curcuma longa* (Katsuyama и др., 2009) и многие другие (рис.6). Относительно небольшой размер гена, отсутствие посттрансляционных модификаций делают ПКС III типа удобным биотехнологическим инструментом.



**Рисунок 6.** Многообразие ПКС III типа из растений и продуктов, которые они продуцируют, в зависимости от механизма реакции. Адаптировано из (Bisht и др., 2021). Поликетиды, полученные в результате: конденсации Кляйзена C6-O-C1 (выделены красным), альдольной конденсации C7-O-C2 (выделены синим), лактонизации C5-O-C1 (выделены зеленым), нециклизованные (выделены черным). VPS – валерофенонсинтаза; PCS – пентакетидхромонсинтаза; ACS – акридонсинтаза; CHS – халконсинтаза; QNS – хинолонсинтаза; BPS – бензафенонсинтаза; STCS – стильбенкарбоксилатсинтаза; STS – стильбенсинтаза; ORS, 2'-оксоалкилрезорцинсинтаза; BBS – бибензилсинтаза; OLS – оливетолсинтаза; BIS – бифенилсинтаза; ALS – алеозонсинтаза; OKS – октакетидсинтаза; DKS – дикетидсинтаза; BAS – бензацетонсинтаза; DCS – дикетид-КоА-синтаза; CURS – куркуминсинтаза; ADS – алкилдикетид-КоА-синтаза; AQS – алкилхинолонсинтаза; AbYPKS – ПКС типа III из *Atropa belladonna*; HsPKS4 – ПКС типа III из *Huperzia serrata*; CTAS – синтаза п-кумароилтриуксусной кислоты; 2-PS – пиронсинтаза; PKSA и PKSB – ПКС, специфичные для пыльников.

В растениях биосинтез поликетидов ПКС III типа происходит с использованием в качестве субстрата КоА-тиоэфиров. Они образуются в ходе реакции, катализируемой 4-кумароил-КоА-лигазой (4CL). 4CL относится к семейству аденилат-образующих ферментов и имеет консервативный участок, связывающий АМФ (Schmelz и Naismith, 2009). Реакция, катализируемая 4CL, двухстадийная, в ходе нее фермент претерпевает изменение конформации, при котором субстрат превращается в аденилатный интермедиат, а затем в тиоэфирную форму (рис.7) (Z. Li и Nair, 2015). Для 4CL характерна субстратная специфичность к растительным фенольным кислотам, а также наличие изоформ, экспрессирующихся тканеспецифично, и отвечающих за биосинтез монолигнолов и фенилпропаноидов (Sutela и др., 2014). В то же время некоторые растения могут использовать одну универсальную изоформу, участвующую в биосинтезе по обоим этим путям (Lavhale и др., 2018).

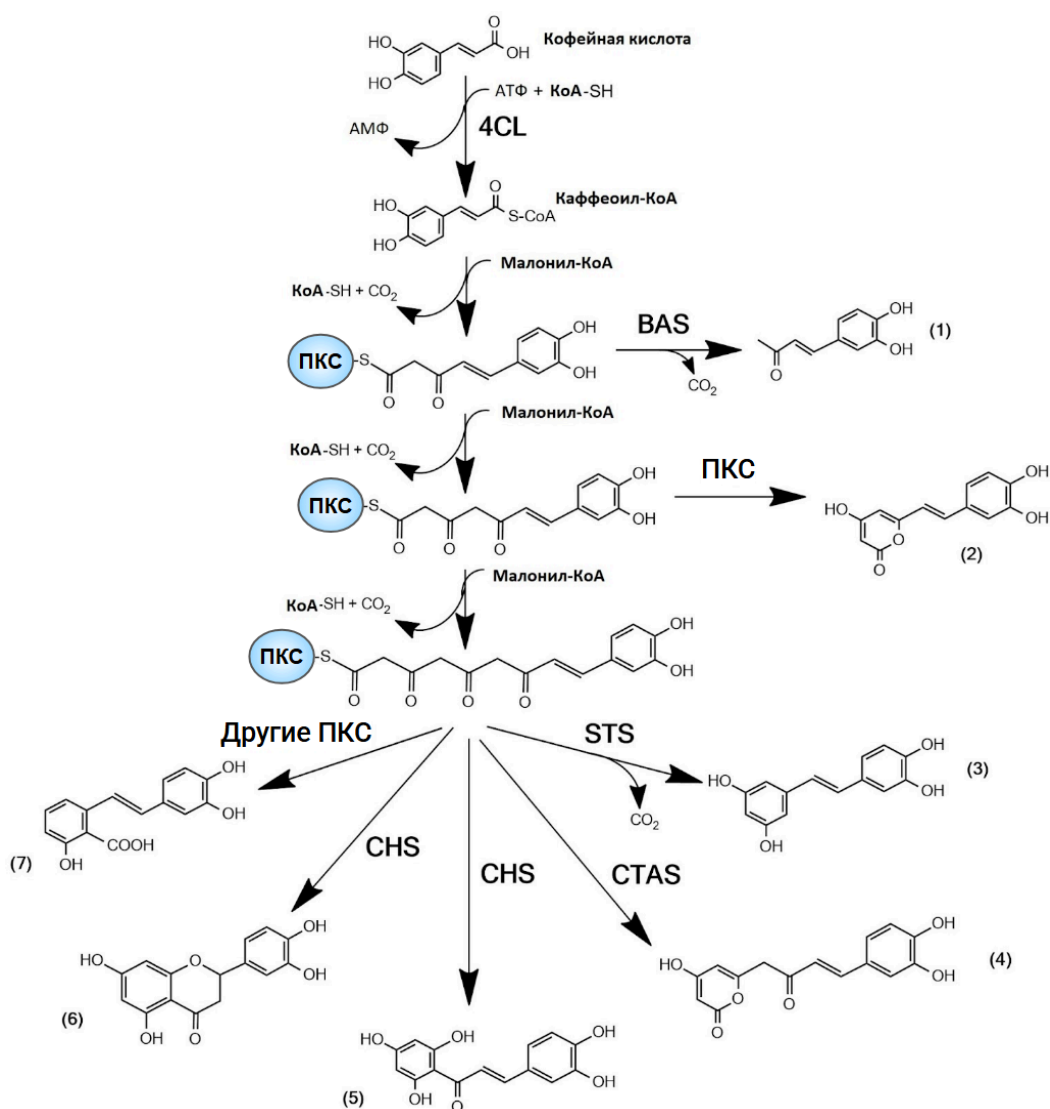


**Рисунок 7.** Реакция биосинтеза каффеоил-КоА, катализируемое 4CL. Адаптировано из (Lavhale и др., 2018).

Долгое время механизм реакции биосинтеза поликетидов, протекающей в активном центре ПКС, оставался не изученным, однако определение структуры халконсинтазы *Medicago sativa* положило начало исследованиям в этой области (Ferrer и др., 1999). В ходе структурного анализа установлено, что типичный активный центр ПКС III типа включает в себя консервативную каталитическую триаду Cys164-His303-Asn336. Кроме того, в ориентации субстратов при удлинении поликетидной цепи помогает «привратник» – Phe215 (Austin и Noel, 2003). Синтез поликетидов инициируется взаимодействием субстрата – КоА-тиоэфира – с сульфгидрильной группой в остатке цистеина активного центра фермента. Затем каталитическая триада позволяет осуществить последовательную конденсацию и удлинение цепи. После этого линейный поликетид подвергается внутримолекулярной конденсации и циклизации в характерную для конкретной ПКС структуру: халкон, стильбен и т.д. Согласно исследованиям, отличия в механизме катализа растительными ПКС III типа связаны со стерическими изменениями в полости активного центра, влияющими на ориентацию линейного тетракетидного промежуточного продукта, хотя этот процесс не до конца изучен (Austin и др., 2004; Shomura и др., 2005). Образующиеся поликетиды могут подвергаться различным модификациям: гликозилированию, метилированию, олигомеризации и др. – и направляться на синтез лигнина, пигментов, защитных факторов, запасных элементов и т.д.

Среди многообразия растительных ПКС гиспидин описан как побочный продукт стильбенсинтаз PmSPS1 и PmSPS2 перца опьяняющего *Piper methysticum*. При этом ферменты имеют субстратное предпочтение, отражающееся в мажорных продуктах при добавлении *in vitro* к ферментам смеси субстратов: 11-метоксибиснорьянгонин (субстрат ферулоил-КоА) и 4-гидрокси-6-стирил-2-пирон (субстрат циннамоил-КоА) для PmSPS1 и дигидробиснорьянгонин (субстрат кумароил-КоА) для PmSPS2 (Pluskal и др., 2019). Оба фермента – гомодимеры и имеют характерную для тиолазы  $\alpha\beta\alpha$  складку.

Биосинтез поликетидов также изучали для хвоща полевого *Equisetum arvense*, т.к. известно, что стирилпироны запасаются в корневищах спорофитов и гаметофитов хвоща как конститутивные метаболиты. Однако, несмотря на то, что гиспидин был найден в *Equisetum arvense*, а также отмеченное сходство биосинтеза стирилпиронов хвоща и биосинтеза халконов, поликетидсинтаза, синтезирующая гиспидин, не определена (Beckert и др., 1997).



**Рисунок 8.** Схема реакции, катализируемой ПКС III типа из растений, и многообразие продуктов, которые теоретически могли бы быть синтезированы из кофейной кислоты с помощью 4CL. Схема представлена на основании описанных реакций для кумаровой кислоты как субстрата с различными ПКС растений. BAS - бензальацетонсинтаза, CHS - халконсинтаза, STS - стилибенсинтаза, CTAS - синтаза п-кумаройлтриуксусной кислоты.

Для ряда растительных ПКС III типа описан биосинтез близкого аналога гиспицина – биснорьянгонина, из п-кумаровой кислоты. В литературе можно найти ферменты ПКС из разных семейств растений, способные взаимодействовать с кумаройл-КоА или КоА-тиоэфирами других фенольных кислот с образованием стилибен-подобных поликетидов (Akiyama и др., 1999; Colpitts и др., 2011; Y.-W. Guo и др., 2013; Sakamoto и др., 2021). Учитывая способность ПКС взаимодействовать с широким кругом схожих субстратов и производить продукты близкие по структурам, можно предположить спектр продуктов, которые могли бы быть синтезированы

растительными поликетидсинтазами III типа, начиная с КоА-тиоэфира кофейной кислоты анализ таких ПКС представляет ценность для данной работы (рис.8).

### 1.3. Медицинские свойства гиспидина

Люди использовали экстракты грибов и растений в качестве источника лекарственных средств с давних времен. Грибы стали неотъемлемым элементом традиционной медицины многих народов в лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы, печени, метаболических расстройств и опухолевых образований (Hobbs, 2002; I.-K. Lee и Yun, 2011). Точные механизмы, лежащие в основе такого эффекта, неизвестны, хотя выделяют полисахариды и низкомолекулярные соединения как основные биологически активные компоненты. На сегодняшний день описаны перспективы применения гиспидина в медицине (Palkina и др., 2021).

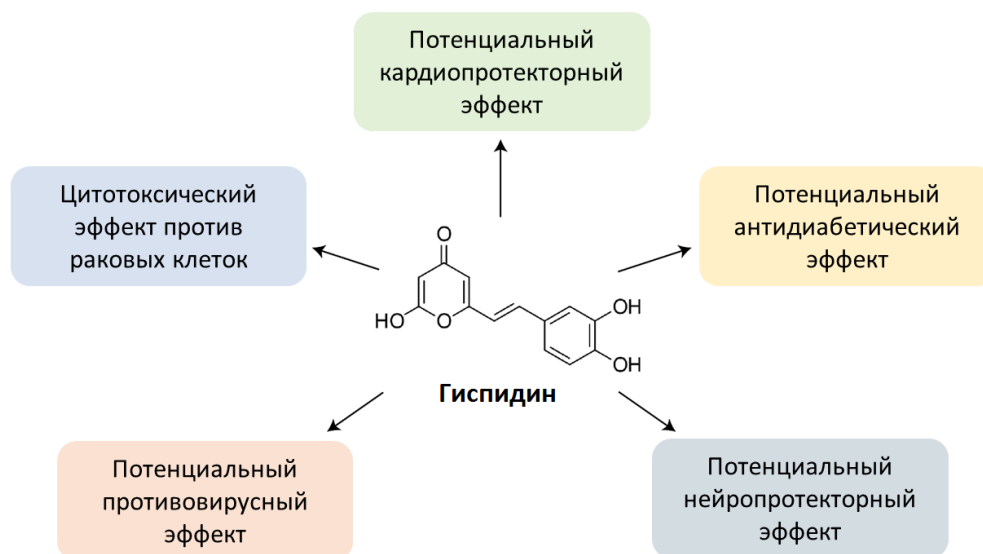
Одно из основных свойств гиспидина – способность проявлять антиоксидантное действие. Как известно, свободные радикалы участвуют в патогенезе нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, метаболических заболеваний, а кроме того, провоцируют и усугубляют развитие опухолей (Shalaby и Catala, 2019). Таким образом, кардиопротекторное, антидиабетическое и цитопротекторное свойства гиспидина могут быть обусловлены снижением повреждения клеток, вызванного окислительным стрессом и активацией сигнальных каскадов, стимулирующих внутренние защитные ресурсы клеток.

Гиспидин ингибирует активность ряда ферментов: протеинкиназы C (Gonindard и др., 1997), нейраминидазы вирусов H1N1, H5N1 и H3N2 (Hwang и др., 2015), фермента, расщепляющего белок-предшественник  $\beta$ -сайта амилоида (BACE1), (Bennett и др., 2013) и других. В случае протеинкиназы C это приводит к торможению сигнальных путей, связанных с гомеостазом клеток и развитием опухоли, хотя точный механизм этого процесса еще предстоит изучить (Pellicano и др., 2009). Также описано ингибирование гиспидином белков сигнальных каскадов опосредующих воспаление (серин/треонинпротеинкиназа 1 – PAK1, транскрипционный фактор NF-kB) (Be Tu и др., 2015; Isakov, 2018). Несмотря на то, что роль гиспидина в регуляции апоптоза слабо изучена, было отмечено его влияние на уровень про- и антиапоптотических белков Bax / Bcl-2 (J. M. Park и др., 2015).

Таким образом, широкий спектр проявленных свойств гиспидина делает его перспективным объектом исследования (рис.9). Однако механизм его действия, как



отмечено выше, недостаточно изучен и для применения на практике требует более детального исследования.



**Рисунок 9.** Потенциальные свойства гиспидина, описанные в медицинских исследованиях. Адаптировано из (Palkina и др., 2021).

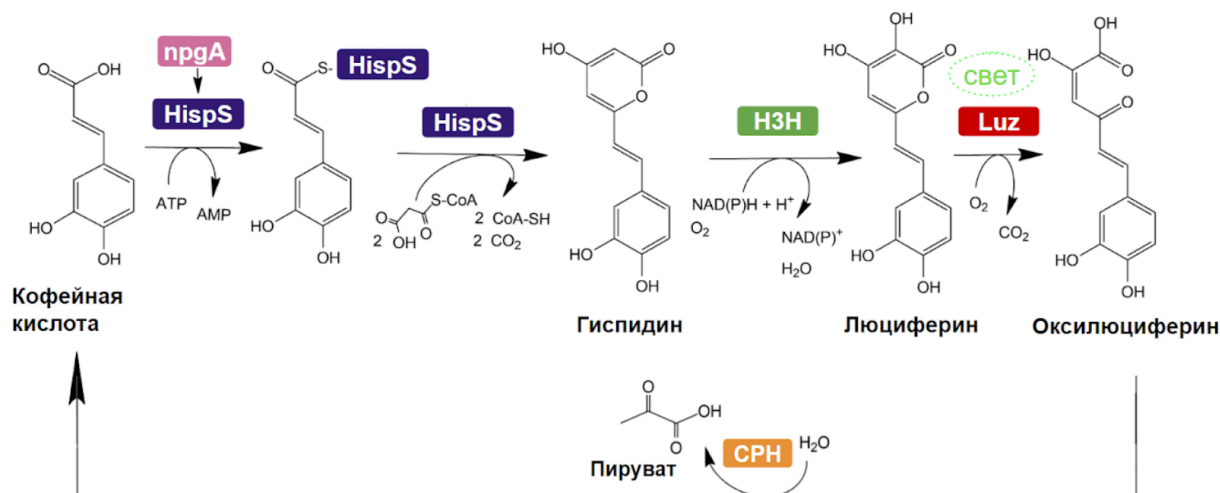
#### 1.4. Роль гиспидина в биолюминесценции грибов

Биолюминесценция – испускание света при окислении низкомолекулярного субстрата – люциферина, катализируемое ферментом люциферазой. Это природное явление было известно давно (Harvey, 1957) и наблюдается среди прокариот и эукариот (Shimomura, 2006). Сейчас реакция биолюминесценции лежит в основе разнообразных аналитических методов и репортерных систем, которые активно применяются в различных областях биологии (Calvache и др., 2024; Kaskova и др., 2016; Roda и Guardigli, 2012; T. Xu и др., 2014).

В 2012 году было продемонстрировано, что перекрестные реакции горячих и холодных экстрактов мицелия разных люминесцентных видов совместимы друг с другом, что дало основание предположить схожую биохимическую основу биолюминесценции грибов (Oliveira и др., 2012). Несмотря на то, что описано множество видов, обладающих способностью свечения, на данный момент, механизм биосинтеза люциферина среди эукариот расшифрован только для высших грибов из порядка *Agaricales* на примере *Neonothopanus nambi* (Kotlobay и др., 2018). Биолюминесцентная система грибов, представленная в виде т.н. цикла кофейной кислоты, включает в себя пять ферментов (рис.10). На первом этапе гиспидинсинтаза



(nnHispS), требующая модификации от фосфопантетеин-трансферазы из *Aspergillus nidulans* (NpgA), катализирует образование гиспидина из кофейной кислоты. Затем гиспидин гидроксилируется гиспидин-3-гидроксилазой *N.nambi* (nnH3H), превращаясь в 3-гидроксигиспидин или люциферин грибов. Далее происходит реакция окисления, катализируемая люциферазой *N.nambi* (nnLuz), сопровождаемая свечением. Замыкает цикл реакция трансформации оксилуциферина в кофейную кислоту под действием кафеоилпируватгидролазы *N.nambi* (nnCPH).



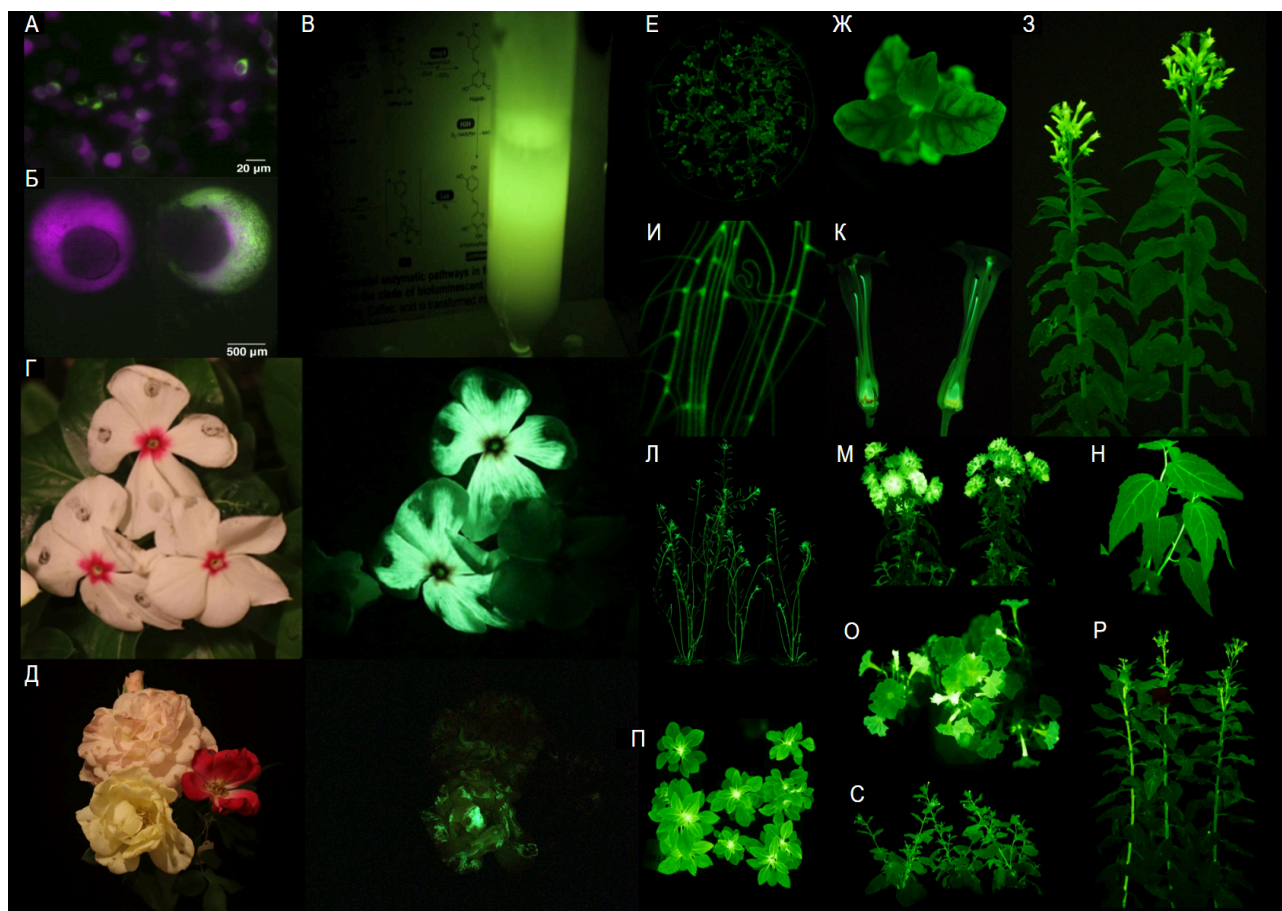
**Рисунок 10.** Схема реакций биoluminesцентной системы грибов - цикл кофейной кислоты с альтернативным путем биосинтеза гиспидина с помощью ПКС растений. Адаптировано из (Palkina и др., 2024). NpgA - фосфопантетеин-трансфераза из *Aspergillus nidulans*, HispS - гиспидинсинтаза *N.nambi*, H3H - гиспидин-3-гидроксилаза *N.nambi*, Luz - люцифераза *N.nambi*, CPH - кафеоилпируватгидролаза *N.nambi*.

Люциферин грибов, или 3-гидроксигиспидин, – субстрат для более чем 70 видов люминесцентных грибов (Oliveira и др., 2012; Stevani и др., 2013). Кросс-эксперименты показали, что гиспидин – универсальный метаболит для разных видов светящихся грибов и присутствует в гораздо больших количествах в несветящихся видах (Purtov и др., 2015). Стоит отметить, что ферменты биoluminesцентной системы грибов обладают некоторой толерантностью к метаболитам, с которыми они взаимодействуют в качестве субстрата. Так, люминесцентной активностью обладал не только гиспидин, но и его близкий аналог – биснорьянгонин (Purtov и др., 2015), что свидетельствует о том, что производное биснорьянгонина может вступать в реакцию не только с H3H, но и с Luz. Также для Luz *N.gardneri* было подтверждено взаимодействие с разными аналогами

люциферина, что приводило к люминесценции с разными максимумами длины волны (Kaskova и др., 2017).

Расшифровка реакций, лежащих в основе биолюминесцентной системы грибов, позволила успешно интегрировать их в метаболизм клеток млекопитающих и растений, создав автономно светящиеся клетки НЕК293Т, а также *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *Catharanthus roseus*, *Rosa Rubiginosa* и многие другие (рис.11) (Khakhar и др., 2020; Mitouchkina и др., 2020). Кроме того, биолюминесцентную систему в растениях удалось исследовать с помощью CRISPR-активации, основанной на инактивированной нуклеазе Cas9 (dCas9). Так, используя dCas9-активируемые промоторы и регулируя их силу, получилось подтвердить предположение, что стадия, катализируемая HispS является лимитирующей (Moreno-Giménez и др., 2022). Выбрав ген HispS в качестве основного репортера и EGFP, как внутренний контроль нормировки сигнала, удалось разработать новую систему количественного анализа автономной люминесценции для *N. benthamiana*, сравнимую по чувствительности с ранее описанной на основе люциферазы светлячка *Firefly luciferase* (FFLuc) и люциферазы *Renilla luciferase* (RLuc) (Calvache и др., 2024).

Существующую биолюминесцентную систему удалось усовершенствовать с помощью подбора новой гиспидинсинтазы из *Mycena citricolor* (mcitHispS), дополнительной фосфопантетеин-трансферазы из *Aspergillus nidulans* (NpgA) и использования мутантов Luz и H3H, добившись увеличения яркости автономно светящихся растений на несколько порядков и заставив светиться новые виды: *Populus canadensis*, *Chrysanthemum morifolium* и *Petunia hybrida* и др. (рис.11) (Shakhova и др., 2024). Кроме того, увеличения яркости биолюминесцентных трансгенных растений удалось добиться с помощью гетерологической экспрессии дополнительного гена 4-кумароилшикимат/хината-3'-гидроксилаза (C3'H1) из *Brassica napus* (Zheng и др., 2023), тирозинаммонийлиазы (TAL) из *Rhodotorula glutinis* и гетеродимерной циннамат-3-гидроксилазы, состоящей из HpaB из *Pseudomonas aeruginosa* и HpaC из *Salmonella enterica*, которые приводили к увеличению продукции кофейной кислоты и гиспидина, а также использовали подавление побочных метаболических ветвей с помощью сайленсинга amiRNA (Ge и др., 2024). Эти исследования показывают высокий потенциал биолюминесцентной системы грибов для дальнейшего исследования, усовершенствования и создания на ее основе новых репортерных инструментов.



**Рисунок 11.** Экспрессия биолуминесцентной системы *N.nambi* в разных гетерологических системах. А) Клетки человека HEK293NT, котрансфицированные люциферазой *N.nambi* с добавлением люциферина (зеленый канал) и красным флуоресцентным белком Katushka (фиолетовый канал). Б) Экспрессия гена люциферазы *N.nambi* в эмбрионе *X. laevis*. Фиолетовый канал указывает на флуоресценцию родамина, а зеленый канал — на биолуминесценцию nnLuz. В) Фотография клеток *P. Pastoris*, экспрессирующих гены nnLuz, nnH3H, nnHispS и NrgA, растущих в среде, содержащей кофейную кислоту. Адаптировано из (Kotlobay и др., 2018).

Фото цветков *Catharanthus roseus* (Г) и *Rosa Rubiginosa* (Д), экспрессирующих гены биолуминесцентной системы *N.nambi*. Фото при дневном свете слева, фото в темноте справа. Адаптировано из (Khakhar и др., 2020).

Биолуминесценция *N. tabacum*, экспрессирующего гены nnLuz, nnH3H, nnCPH, nnHispS, на стадиях: прорастания Е), вегетативной Ж), цветения З). И) Световое излучение корней и поперечного среза цветов К). Адаптировано из (Mitouchkina и др., 2020).

Биолуминесценция улучшенной биолуминесцентной системы в *Arabidopsis thaliana* (Л) *Chrysanthemum morifolium* (М) *Populus canadensis* (Н) *Populus canadensis* (О-П) *Nicotiana tabacum* (Р) *Nicotiana benthamiana* (С). Адаптировано из (Shakhova и др., 2024).

### 1.5. Гетерологическая экспрессия генов ферментов биосинтеза поликетидов

Несмотря на то, что природа богата биологически активными соединениями, существует необходимость разработки искусственного биосинтеза и его оптимизации с помощью генно-инженерных методов. Быстрое развитие синтетической биологии позволило сделать производство поликетидов с помощью микроорганизмов эффективным и удобным альтернативным подходом, не зависящим от климата, доступности субстрата, экологических условий, а также сократить количество стадий очистки и повысить выход целевых продуктов. Так, с помощью платформы микробного биосинтеза были произведены алкалоиды (Srinivasan и Smolke, 2020), флавоноиды (W. Zhang и др., 2017), терпены (Belcher и др., 2020) растений, а также биотопливо (Peralta-Yahya и др., 2012).

Непростой задачей при гетерологическом биосинтезе поликетидов, как и при внедрении других биохимических каскадов, является его оптимизация, так как добавление чужеродного пути оказывает нагрузку на метаболизм и может истощать ресурсы клетки-хозяина. В работе с ПКС стоит также учитывать широкую субстратную специфичность и вариабельность образующихся продуктов, которые пока сложно предсказать рационально. Современные подходы, основанные на подборе организма-хозяина, повышении доступности субстрата и снижении метаболической нагрузки на продуцента, применяющиеся в данной области, описаны далее.

#### 1.5.1. Выбор гетерологического хозяина для производства поликетидов

Поликетиды – биологически активные соединения, которые применяются в медицине, промышленности и сельском хозяйстве, поэтому их синтез из простых метаболитов стараются оптимизировать в биоинженерных гетерологических системах. Наиболее распространенными хозяевами для этого являются *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae*. Они хорошо охарактеризованы, обладают высокой скоростью роста, для работы с ними доступны молекулярно-биологические инструменты, а анализировать реакцию и продукты *in vivo* можно в короткие сроки.

Преимуществом *E. coli* является то, что бактерии могут производить большое количество ароматических аминокислот, которые оптимально использовать для синтеза поликетидов (Gosset, 2009; Lütke-Eversloh и др., 2007). Дрожжи *S. cerevisiae* как гетерологический хозяин позволяют проводить функциональную экспрессию эукариотических ферментов с необходимыми посттрансляционными модификациями,

а кроме того, в данной системе удобно синтезировать растительные мембраноассоциированные белки (Krivoruchko и Nielsen, 2015).

Менее распространенной, но перспективной системой экспрессии являются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*). В отличие от *S. cerevisiae*, их рост может происходить на простой, недорогой среде с использованием метанола или глицерина в качестве источника углерода, они обладают высокой скоростью роста и могут достигать большой плотности, что позволяет повысить выход целевого продукта (Gao и др., 2021). Утилизация глюкозы *P. pastoris* происходит менее интенсивно в сравнении с *S. cerevisiae*, доля гликолиза в метаболизме меньше, а пентозофосфатного пути больше, что обеспечивает эффективную регенерацию НАДФН, а также снижение побочных продуктов гликолиза (Peña и др., 2018). Кроме того, для *P. pastoris* можно использовать сильные конститутивные и индуцибельные промоторы, позволяющие контролировать уровень экспрессии рекомбинантных белков. Геном *P. pastoris* *GS115* был секвенирован, аннотирован (De Schutter и др., 2009; <http://www.pichiagenome.org>), молекулярно-биологические инструменты для *P. pastoris* активно разрабатываются (*Addgene: MoClo Pichia Toolkit*; Obst и др., 2017; Weninger и др., 2015) и существующие протоколы для *S. cerevisiae* во многом подходят *P. pastoris* (Peña и др., 2018).

Менее распространенные биотехнологические хозяева также обладают ценными свойствами для биосинтеза поликетидов. Так, преимуществом почвенных бактерий *Streptomyces venezuelae* является их способность осуществлять ряд сложных посттрансляционных модификаций (фосфорилирование, ацетилирование, фарнезилирование и гликозилирование), которые позволяют синтезировать поликетиды и другие биологически активные соединения, как нативно, так и в качестве гетерологического хозяина (R. Liu и др., 2018; Risdian и др., 2019).

Другой прокариотический хозяин *Corynebacterium glutamicum* успешно использовался как продуцент аминокислот (Becker и др., 2011), ароматических соединений и растительных поликетидов (Kallscheuer и др., 2016; Kallscheuer и Marienhagen, 2018). В отличие от многих других, он способен использовать ароматические соединения, в частности, п-кумаровую, кофейную и феруловую кислоты как единственный источник углерода (Kallscheuer и др., 2016). Кроме того, на основе *C. glutamicum* были созданы штаммы с заблокированными катаболическими путями фенилпропаноидов. Это позволило оптимизировать биосинтез стильбенов и флаванонов (Kallscheuer и др., 2016).

Метаболизм маслянистых дрожжей *Yarrowia lipolytica* приспособлен для накопления липидов, что обеспечивает высокий уровень ацетил-КоА и активность цикла трикарбоновых кислот, создающие благоприятные метаболические условия для использования данного организма как фабрики для производства поликетидов (Abdel-Mawgoud и др., 2018). Кроме того, рост при широком диапазоне pH, солености, различных субстратах – источниках углерода, делает *Y. lipolytica* не только привлекательным для исследователей, но и выгодным с точки зрения экономии производства (Michely и др., 2013). Хотя альтернативные микробиологические хозяева обладают рядом преимуществ, используются они редко, что связано, в первую очередь, с ограничением инструментов биоинженерии.

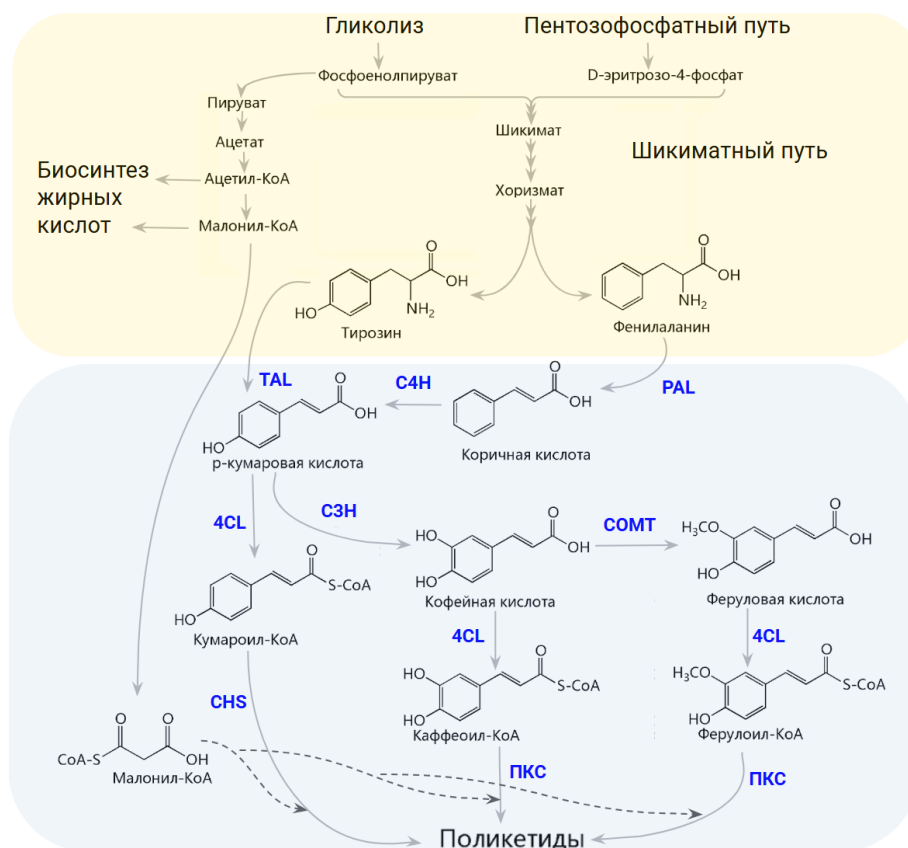
### **1.5.2. Подходы к оптимизации биосинтеза поликетидов**

Одной из нерешенных проблем в гетерологическом биосинтезе растительных поликетидов является низкий выход целевого продукта (Tong и др., 2021). Для решения этой задачи используется ряд подходов, которые можно подразделить на стратегию увеличения доступности субстратов ПКС и стратегию снижения метаболической нагрузки на организм-хозяин (рис.12).

Для образования поликетидов необходимы субстраты 2-х типов: стартер (КоА-производное) и элонгатор (обычно малонил-КоА); для эффективной работы ПКС можно повышать доступность каждого из них (С. Liu и Li, 2022). Кроме того, добиться роста производительности можно за счет объединения ПКС и других ферментов метаболического каскада в химерные конструкции, что позволяет оптимально ориентировать их в пространстве (Y. Wang и др., 2011). Некоторые исследователи используют стратегии по совместному культивированию штаммов, подбор генов биосинтеза поликетидов для отдельной стадии, а также оптимизацию уровня экспрессии. На этих подходах остановимся подробнее далее.

### Внутриклеточный метаболизм

### Гетерологический путь



**Рисунок 12.** Гетерологический биосинтез поликетидов, взаимодействующий с внутриклеточным метаболизмом организма-хозяина. Адаптировано из (С. Liu и Li, 2022). TAL - тирозинаммонийлиаза, PAL - фенилаланин-аммоний-лиаза, C4H - циннамат-4-гидроксилаза, 4CL - 4-кумароил-КоА-лигаза, C3H - кумарат-3-гидроксилазой, COMT - O-метилтрансфераза кофейной кислоты, CHS - халкон-синтаза.

#### 1.5.2.1. Увеличение доступности КоА-тиоэфиров – субстратов ПКС

С точки зрения биотехнологии, биосинтез КоА-производных субстратов ПКС выгодно производить эндогенно. КоА-тиоэфиры гидроксикоричных кислот образуются в несколько этапов: вначале шикиматный путь приводит к биосинтезу тирозина и фенилаланина, затем они трансформируются в коричную и гидроксикоричные кислоты и потом активируются при добавлении КоА-группы. Оптимизация каждого этапа вносит свой вклад в увеличение продукции поликетидов.

Усиление шикиматного пути в бактериях состоит в повышении доступности фосфоенолпировата и D-эритрозо-4-фосфата и усилению реакции с образованием 3-дезоксид-арабино-гептулозонат-7-фосфата (ДАГФ), что достигается за счет сверхэкспрессии генов фосфоенолпироватсинтазы (ppsA) и транскетолазы (tktA) (W. Zhang и др., 2017). Кроме того, для повышения продукции поликетидов в качестве мишени для нокаута был использован фактор транскрипции *tutR*, репрессирующий

гены пути биосинтеза тирозина (Yuan и др., 2020). Усилить эффект удаления репрессора позволила оверэкспрессия мутантов ДАГФ-синтазы ( $\text{aroG}^{\text{fbr}} = \text{aroG D146N}$ ) и хоризматмутаза/префенатдегидрогеназы ( $\text{tyrA}^{\text{fbr}} = \text{tyrA M53I, A354V}$ ), устойчивых к ингибированию обратной связи (Hong и др., 2020; Yuan и др., 2020) (рис.13).

В экспрессионной системе дрожжей аналогичные подходы также успешно применяют, сочетая использование устойчивых к ингибированию мутантов ДАГФ-синтазы (ARO4 K229L) и хоризматмутаза (ARO7 G141S) (M. Li и др., 2015) и подавление конкурирующих метаболических путей трансформации гидроксифенилпирувата (H. Li и др., 2021). Улучшения титра кумаровой кислоты удалось добиться с помощью введения в метаболизм дрожжей пути на основе фосфокетолазы для направления гликолитического потока в сторону образования эритрозо-4-фосфата (Q. Liu и др., 2019).

Для повышения выхода целевого поликетиды иногда используют экзогенное увеличение субстрата. Фенилаланин и тирозин добавляют в среду так, чтобы эффективность биосинтеза была выше, а клетки не испытывали затруднений с первичным метаболизмом клеточного роста. В некоторых случаях поликетиды синтезируют, добавляя фенилпропаноидные кислоты (коричную, кумаровую, кофейную и феруловую) с определенной периодичностью (Yan и др., 2005). Однако не всегда это приводит к значительному росту концентрации поликетидов, что, по всей видимости, отражает наличие лимитирующей стадии в гетерологическом метаболическом пути. Существуют предположения, что низкий выход поликетидов может быть связан с лимитирующим этапом, катализируемым C4H, отмеченным в работе (Yan и др., 2005), или C3H, отмеченным в работе (Hernández-Chávez и др., 2019), или из-за отсутствия сборки метаболома в дрожжах (Trantas и др., 2009).

Еще одной стратегией по оптимизации биосинтеза соединений является создание белков слияния, или фьюзов. Считается, что такая конструкция позволяет имитировать колокализацию ферментов в клетках и/или располагать активные центры белков, в которых образуются промежуточные соединения, в непосредственной близости друг от друга, что приводит к увеличению эффективности работы системы (Y. Zhang и др., 2006). Так, усовершенствовать биосинтез ресвератрола позволило создание фьюза стильбенсинтазы из *Vitis vinifera* и 4CL из *Arabidopsis thaliana*, соединенных коротким глицин-сериновым линкером (Y. Wang и др., 2011). Однако



такой подход имеет ограничения и не универсален для всех ферментов и поликетидов (M. Li и др., 2015; Q. Liu и др., 2021).

Важной проблемой при гетерологической продукции гидроксикоричных кислот, является токсическое действие кумаровой и кофейной кислоты на *E. coli*, которое приводит к снижению скорости роста и продуктивности. Для решения этого предлагается избегать накопления соединений до токсичного уровня за счет отслеживания времени инкубации и использования белков-насосов, транспортирующих ароматические соединения наружу из клетки (Huang и др., 2013; Sariaslani, 2007).

### 1.5.2.2. Увеличение доступности малонил-КоА

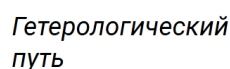
Доступность малонил-КоА ограничивает биосинтез природных соединений, поэтому изучению этого аспекта уделяется особое внимание (Milke и Marienhagen, 2020). В клетке малонил-КоА синтезируется из ацетил-КоА в реакции, катализируемой ацетил-КоА-карбоксилазой (АСС), и расходуется в основном на биосинтез жирных кислот (Cronan и Thomas, 2009). Повышение доступности ацетил-КоА позволяет добиться роста уровня малонил-КоА. Накопление ацетил-КоА может быть достигнуто, во-первых, усилением метаболических путей потребления глюкозы и ее утилизации через гликолиз (S. Zhang и др., 2019), а также сверхэкспрессией ацетил-КоА-синтазы (АСС) нативной формы (Zha и др., 2009) или ее мутанта из *Salmonella enterica* SeACS L641P (Y. Chen и др., 2013) (рис.13). Во-вторых, используют подавление вовлечения ацетил-КоА в синтез этанола алкогольдегидрогеназой (Zha и др., 2009) и в цикл трикарбоновых кислот или глиоксилатный шунт (Lian и др., 2014).

Превращение ацетил-КоА в малонил-КоА, катализируемое гетерологическим АСС, встречается в работах (Shin и др., 2012; S. Zhou и др., 2021), однако связано с рядом сложностей. Нативный АСС в бактериях ингибируется ацилированным АСР по принципу обратной связи (Davis и Cronan, 2001). Большой размер АСС также часто является препятствием к его использованию и на практике часто предпочитают АСС из *C. glutamicum*, который состоит из 2 субъединиц (AccB1, AccD1) (Cheng и др., 2016). Транскрипционная регуляция АСС (*accBC* и *accD1*) *C. glutamicum* происходит под контролем репрессора FasR (Irzik и др., 2014). Внесение мутации в FasR повышало продукцию малонил-КоА зависимых жирных кислот (Takeno и др., 2013), но в рамках биосинтеза нарингенина подобного эффекта не наблюдалось, что,

вероятно, связано со сложностью разобщения этих метаболических путей. При этом внесение мутаций в промоторы генов *accBC* и *accD1* приводило к росту биосинтеза жирных кислот и растительного пентакетидов. Предполагается, что такой эффект связан с нарушением взаимодействия этого регуляторного участка и FasR (Milke, Kallscheuer и др., 2019). Посттрансляционная регуляция ACC в *S. cerevisiae* происходит путем фосфорилирования с помощью Snf1p (неферментирующего сахарозу белка 1) и приводит к ингибированию активности ACC (Shirra и др., 2001). Поэтому в работах используют мутанты ScAcc1p<sup>S659A, S1157A</sup>, резистентные к такой регуляции (M. Li и др., 2015). Также был описан термочувствительный вариант ACC1, который показал свою эффективность в *S. cerevisiae* (Al-Feel и др., 2003). Еще одной модификацией, регулирующей активность ACC, является биотинилирование, которое осуществляет дополнительный фермент – биотинлигаза (Rodrigues и др., 2015), что также стоит учитывать при гетерологической экспрессии.

Другой, ACC-независимый, способ увеличить уровень малонил-КоА – его получение из малоната с использованием генов малонил-КоА-синтетазы (*matB*) и белка носителя малоната (*matC*) из *Rhizobium trifolii* (J. Wu и др., 2014), а также малонил-КоА-синтетазы из *Arabidopsis thaliana* (AAE13) (Y. Wang и др., 2014) (рис.13).

Повышая уровень малонил-КоА, стоит учитывать, что помимо биосинтеза поликетидов, он будет расходоваться на синтез жирных кислот. Избежать такого нецелевого оттока малонил-КоА помогут блокаторы биосинтеза жирных кислот, среди которых распространен церуленин – неселективный и необратимый ингибитор синтазы жирных кислот (СЖК). Механизм работы церуленина состоит в ковалентном связывании с цистеином консервативного кетосинтазного домена СЖК (Price и др., 2001). В ряде работ использование этого ингибитора позволило увеличить выход поликетидов (Leonard и др., 2008; C. G. Lim и др., 2011). Однако этот блокатор обладает недостатками. Истощение жирных кислот тормозит рост клетки-хозяина. Кроме того, кетосинтазный домен СЖК и ПКС консервативны, могут иметь высокую степень гомологии и подвергаться ингибированию церуленином (Fetter и др., 1999). Помимо прочего, церуленин – дорогостоящий препарат, что также ограничивает его широкое применение в исследованиях и на производстве (Milke, Ferreira и др., 2019). Среди недавних работ встречается подавление биосинтеза жирных кислот посттранскрипционно за счет антисмысловых РНК (Yang и др., 2015), малых регуляторных РНК или с помощью интерференции CRISPR (J. Wu и др., 2015).



### 1.5.2.3. Совместное культивирование штаммов

Совместное культивирование штаммов – перспективный подход, который позволяет снизить метаболическую нагрузку на каждый организм и, как следствие, увеличить выход целевого продукта. Такая стратегия используется для *E. coli* и для *S. cerevisiae*, а также для их совместного культивирования. Такое разделение гетерологического пути на этапы: производство кумаровой кислоты и биосинтез поликетидов, позволило получить высокие выходы ресвератрола (Hong и др., 2020), нарингенина (Ganesan и др., 2017), куркуминоидов (Fang и др., 2018) и других поликетидов (Du и др., 2020). Подбор оптимальных условий сокультивирования (pH, температура, источник углерода и т.д.) для разных организмов в едином пути

биосинтеза целевого продукта может стать одним из направлений совершенствования данного подхода.

Для преодоления узких мест в производстве поликетидов используют подбор ферментов для эффективного катализа определенной стадии. Такой отбор ведется как для отдельной стадии CHS (Tong и др., 2022), так для комбинации ферментов 4CL + CHS (Mark и др., 2019), TAL + 4CL + CHS + CHI (Santos и др., 2011). В рамках такого подхода важно обращать внимание не только на повышение эффективности производства метаболита определенной стадии, но и на сочетание ферментов, т.к. некоторые соединения могут по принципу отрицательной обратной связи регулировать другие ферменты каскада (Santos и др., 2011).

Экспрессии генов ферментов также уделяется внимание при налаживании биосинтеза целевого соединения. Здесь стоит отметить как стандартные способы: увеличение силы промоторов или использование индуцибельных промоторов, оптимизацию кодонов для конкретного гетерологического хозяина (Santos и др., 2011), но также и недавно описанную модульную стратегию оптимизации. Модульная стратегия оптимизации или стратегия итеративной высокопроизводительной балансировки (iterative high-throughput balancing (ИТВ)) заключается в анализе библиотеки сочетаний плазмид с разным числом копий и конститутивными промоторами разной силы для балансировки метаболитов (S. Zhou и др., 2019). Такой подход позволяет добиться высокого уровня производства не только поликетидов, но и других биологически активных соединений без добавления дорогостоящих субстратов и индукторов, и кроме того, избежать негативного влияния гетерологического пути на рост клеток и метаболического истощения культуры (G. Wu и др., 2016).

Сочетая данные стратегии в разных гетерологических системах, удалось не только контролируемо масштабировать получение необходимых соединений, экономить на процессе выращивания, экстракции и очистки, но также получить платформу для изучения новых природных соединений и ферментов, участвующих во вторичном метаболизме растений. Достижения исследователей, работающих в области метаболической инженерии биосинтеза природных растительных соединений, суммированы в недавно вышедших обзорах: (Cravens и др., 2019; Hernández-Chávez и др., 2019; C. Liu и Li, 2022).

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Методы молекулярной биологии

#### 2.1.1 Дизайн векторов для дрожжей

##### 2.1.1.1 Дизайн векторов для экспрессии ПКС небиолюминесцентных грибов

Для анализа работы поликетидсинтаз небиолюминесцентных грибов были собраны конструкции с полноразмерным (WT) и усеченными вариантами ( $\Delta 2$ ,  $\Delta 2\_C$ ) генов *cgPKS*, *hsPKS* и *gcPKS*. Аминокислотные последовательности генов *cgPKS*, *hsPKS* и *gcPKS* приведены в таблице 3 (Приложение). В связи с большим размером генов (~8.8 т.п.н.) было решено разбить их на фрагменты, которые были заказаны в виде синтетической линейной ДНК. Сборку осуществляли поэтапно через плазмиды уровня Level -1 (*pAGM1311*) из *MoClo Toolkit* (*Addgene: MoClo Toolkit*) с последующим объединением в плаزمиды уровня Level 0 из *MoClo Toolkit* (*Addgene: MoClo Toolkit*), согласно стратегии модульного клонирования. Затем в плазмиде на уровне Level 1 происходила сборка финального вектора с промотором глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*pGAP*) и терминатором алкогольоксидазы (*tAOX*). Вектор также содержал ген устойчивости к зеоцину для селективного отбора целевых колоний. Список созданных векторов приведен в таблице 6 (Приложение).

##### 2.1.1.1 Дизайн векторов для экспрессии ПКС III типа и 4CL из растений

Для ПКС III типа и 4CL из растений сборка векторов также происходила с помощью модульного клонирования. Для этого были заказаны синтетические фрагменты генов ПКС и 4CL (табл.1 и табл.2, Приложение), которые клонировали в плазмиды уровня Level 0 из *MoClo Toolkit* (*Addgene: MoClo Toolkit*). В векторах на уровне Level 1 из *MoClo Toolkit* (*Addgene: MoClo Toolkit*) происходило их объединение с промотором *pGAP* и терминатором *tAOX*. Селективный отбор трансформаций в случае с ПКС происходил с помощью кассеты устойчивости к зеоцину. Отбор трансформаций для 4CL происходил при добавлении антибиотика гигромицина. Список созданных векторов приведен в таблице 6 (Приложение).

### 2.1.2 Дизайн векторов для клеток млекопитающих

Для временной экспрессии в клетках млекопитающих гены nnLuz, nnH3H, nnHisps, NpgA, ПКС экспрессировались под контролем промотора цитомегаловируса (pCMV) и терминатора SV40. Экспрессия гена 4CL регулировалась промотором фактора элонгации 1 альфа (pEF1 $\alpha$ ) и терминирующим сигналом полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH). Этот набор плазмид также был создан в соответствии со стандартом модульного клонирования Golden Gate. Список созданных векторов приведен в таблице 6 (Приложение).

### 2.1.3 Дизайн векторов для растений

Для экспериментов на растениях гены nnLuz, nnH3H, nnHisps, NpgA, ПКС, 4CL клонировали в вектора уровня Level 1 из MoClo Toolkit (*Addgene: MoClo Toolkit*, n.d.) для трансформации, опосредованной агробактериями. Все гены клонировали под контролем конститутивных промоторов вирусного происхождения из набора MoClo plant parts kit (*Addgene: MoClo Plant Parts Kit*, n.d.). Ген nnLuz находился под контролем промотора 35S размером 1.4 т.п.н. из вируса мозаики цветной капусты с 5'-нетранслируемой областью (UTR) омега-вируса TMV и терминатором октопинсинтазы из *Agrobacterium tumefaciens* (tOCS). Гены ПКС, nnHisps, nnCPH экспрессировались в векторах, содержащих промотор 35S размером 0.4 т.п.н. из вируса мозаики цветной капусты с 5'-UTR омега-TMV и терминатором tOCS. Ген nnH3H был под контролем конститутивного промотора FMV из вируса мозаики инжира и терминатора нопалинсинтазы из *Agrobacterium tumefaciens* (tNOS). Ген NpgA и 4CL были контролем промотора вируса желтого скручивания листьев цеструма (pCmYLCV) и терминатора АТФазы из *Solanum lycopersicum*.

Для создания стабильных линий плазмиды уровня Level 1 были объединены в вектора уровня Level M из MoClo Toolkit (*Addgene: MoClo Toolkit*) с кассетой устойчивости к антибиотику гигромицину или канамицину для осуществления отбора. Список созданных векторов приведен в таблице 6 (Приложение).

Векторы для сравнения конструкций с BeYDV и TMV, использованные в работе, были собраны с использованием GoldenBraid (GB) (Sarrion-Perdigones и др., 2013).

## **2.1.4 Создание генетических конструкций**

### **2.1.4.1 Химический синтез последовательностей ДНК**

Химический синтез последовательностей ДНК заказывали в фирмах Integrated DNA Technologies или Twist Bioscience. Оптимизацию последовательностей нуклеотидов производили с помощью ресурса Codon Optimization Tool (<https://eu.idtdna.com/CodonOpt>). Заказанные последовательности генов содержали сайты узнавания рестриктазы BbsI для клонирования их в соответствующие плазмиды уровня Level 0 или сайты узнавания рестриктазы BsaI для клонирования фрагмента последовательности в вектор уровня Level -1.

### **2.1.4.2 Амплификация ДНК**

Амплификацию ДНК для сборки генетических конструкций и их тестирования (скрининга колоний) проводили с использованием стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Реакцию смешивали и инкубировали согласно протоколам наборов Encyclo PCR Kit и Screen Mix Kit (Евроген). Синтез олигонуклеотидов для реакции амплификации был заказан в компании Евроген. Используемые праймеры приведены в таблице 5 (Приложение). Наличие ПЦР-продукта определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Для дальнейшего использования ДНК-продукта проводили его очистку с помощью коммерческого набора Cleanup Standart или Cleanup Mini (Евроген).

### **2.1.4.3 Электрофорез ДНК в агарозном геле**

Электрофорез ДНК проводили в 1-1.5% агарозном геле в ТАЕ-буфере (40 мМ Трис ацетат, 2 мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия до концентрации 0.5 мкг/мл при 10 В/см в течение 10-15 мин. Для визуализации образцов ДНК в агарозном геле использовали буфер для нанесения 4X Gel Loading Dye, Blue (Евроген) в соотношении 3:1. Для анализа ПЦР-продуктов и векторов был использован маркер длин 1 kb DNA Ladder (NEB). Визуализацию геля проводили с помощью системы имаджинга Gel Doc EZ Imager (BioRad).

#### **2.1.4.4 Экстракция ДНК из реакционной смеси или из агарозного геля после электрофоретического разделения**

Экстракцию ДНК из реакционной смеси или из агарозного геля после электрофоретического разделения производили с помощью коммерческого набора Cleanup Standart или Cleanup Mini (Евроген) по рекомендациям производителя.

#### **2.1.4.5 Реакция модульного клонирования**

Реакция модульного клонирования производилась по технологии Golden Gate и протоколам, рекомендованным (Engler и др., 2014; M. E. Lee и др., 2015; Weber и др., 2011). Реакционная смесь содержала по 100 нг плазмид, необходимых для сборки, буфер для T4 ДНК лигазы (Евроген), 10 ед. T4 ДНК лигазы (Евроген) и 10 ед. рестриктазы BsaI (Eco31I) (Thermo Fisher Scientific) (для плазмид уровня Level 1 или Level -1) или BpiI (BbsI) (Thermo Fisher Scientific) (для плазмид уровня Level 0 и Level M). Реакцию проводили при циклическом чередовании стадий рестрикции: температура 37°C в течение 1.5 мин и лигирования: температура 16°C в течение 3 мин. Количество циклов обычно составляло 25-30. Структура векторов MoClo Toolkit (*Addgene: MoClo Toolkit*), со встроенными кассетами устойчивости, позволяла отобрать колонии разных уровней сборки за счет чередования антибиотиков: Level -1 (канамицин), Level 0 (спектиномицин), Level 1 (ампициллин), Level 1-подобный вектор для дрожжей (зеоцин, или канамицин, или гигромицин), Level 1-подобный вектор для млекопитающих (канамицин), Level M (спектиномицин).

#### **2.1.4.6 Выделение плазмидной ДНК**

Биомассу колонии бактерий, содержащей рекомбинантную плазмиду, инокулировали 5 мл среды LB (Lysogenic Broth) с селективным антибиотиком и инкубировали в стеклянной пробирке при перемешивании (220 об/мин) и 37°C в течение 12-16 ч в термостатируемом шейкере. Выделение плазмидной ДНК производили с использованием набора для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген) по рекомендациям производителя. Для векторов, которые использовали для трансфекции клеток млекопитающих, использовали набор для выделения плазмидной ДНК фирмы QIAGEN Plasmid Mini Kit (*QIAGEN Plasmid Kits*). Для измерения концентрации полученных ДНК-образцов использовали прибор Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).



#### **2.1.4.7 Секвенирование ДНК по методу Сэнгера**

Определение последовательности фрагментов ДНК производилось по методу Сенгера компанией Евроген. Используемые праймеры приведены в таблице 5 (Приложение). Выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей проводили в онлайн-ресурсе Benchling.

#### **2.1.5 Методы работы с бактериями**

##### **2.1.5.1 Протокол приготовления компетентных бактериальных клеток**

Бактериальные клетки высевали из замороженного стока ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) на 5 чашек с твердой средой LB и селективным антибиотиком и инкубировали 24 часа при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  для *E.coli XLI-Blue* и при  $27^{\circ}\text{C}$  для *A. tumefaciens*. Затем всю биомассу бактерий с помощью шпателя добавляли в 800 мл жидкой среды SOB (super optimal broth) и наращивали при качании до 1 единицы оптической плотности при 600 нм. После этого последовательно промывали деионизированной водой и раствором 10% глицерина. Осадок бактериальной биомассы ресуспендировали в 6 мл воды, разделяли на аликвоты по 45-80 мкл и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Для трансформации реакционной смеси или плазмиды использовали по 1 замороженной аликвоте.

##### **2.1.5.2 Трансформация клеток бактерий методом электропорации**

Для трансформации путем электропорации фасовку компетентных клеток размораживали на льду и смешивали с 20 нг трансформирующей ДНК, очищенной от солей, или очищенной реакционной смесью. Суспензию клеток переносили в кюветы для электропорации с зазором 0.1 см (Eppendorf) и подвергали электропорации на приборе MicroPulser (Bio-Rad) по стандартному протоколу для *E. coli* или *A. tumefaciens*. После электропорации в кювету добавляли 1 мл среды SOB, клетки переносили в чистую пробирку и инкубировали при качании 30-60 мин при  $37^{\circ}\text{C}$  для *E. coli* или 2-3 ч для  $27^{\circ}\text{C}$  *A. tumefaciens*, а затем высевали на чашки со средой и селективным антибиотиком.

## 2.1.6. Генотипирование и определение уровня экспрессии

### 2.1.6.1 Выделение геномной ДНК

Биомассу дрожжей или растений перетирали в жидком азоте с помощью ступки и пестика. Затем выделение геномной ДНК из измельченного биоматериала проводили с использованием набора ExtractDNA Blood и Cells (Евроген) по протоколу производителя.

### 2.1.6.2 Подтверждение встройки в геномную ДНК

Подтверждение встройки в геномную ДНК производили с помощью ПЦР с праймеров, специфичных к анализируемой последовательности. Для оценки качества проведенной реакции использовали пару праймеров специфичных к гену домашнего хозяйства *ACT1* (Schwarzhans и др., 2016) для *P. pastoris* и ACT (AY594294) (D. Liu и др., 2012) для *Nicotiana benthamiana*. Наличие и размер соответствующего ПЦР-продукта определяли с помощью электрофореза в агарозном геле.

### 2.1.6.3 ПЦР в реальном времени

Для определения уровня экспрессии генов биомассу образцов быстро замораживали в жидком азоте и гомогенизировали для экстракции РНК с помощью набора TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Синтез первой цепи кДНК осуществляли с помощью набора MMLV (Евроген). RT-ПЦР проводили с использованием набора qPCRMix-HS SYBR + LowROX (Евроген) на амплификаторе для ПЦР в реальном времени 7500 (Applied Biosystems) с отжигом праймеров специфичных к анализируемым генам и гену домашнего хозяйства *ACT1* в качестве контроля. Программа состояла из следующих стадий: 95°C в течение 1 мин, затем 40 циклов по 95°C в течение 30 с, 60°C в течение 30 с и 72°C в течение 30 с. Размер продукта ПЦР подтверждали определением кривой плавления.

## 2.2 Методы работы с дрожжами *Pichia pastoris* GS115

### 2.2.1 Протокол приготовления компетентных клеток дрожжей

Клетки из глицерольного стока высевали на твердую среду YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза, агар) с селективными антибиотиками и инкубировали 48-72 ч при 30°C. Биомассой одного клона инокулировали 5 мл жидкой

среды YPD без антибиотиков и инкубировали при качании при 30°C в течение 8-10 часов. Далее часть суспензии разбавляли в жидкой среде YPD без антибиотиков в 10-100 раз и инкубировали при качании при 30°C в течение 12-16 ч до 1.5-2 единиц оптической плотности при 600 нм. Затем клетки концентрировали с помощью центрифугирования, переносили в 5 мл среды YPD с добавлением 1 мл HEPES (1 M) и 125 мкл DTT (1 M) и инкубировали 15-20 мин при качании при 30°C. Затем клетки несколько раз последовательно промывали охлажденными деионизированной водой и затем сорбитолом (1 M). Биомассу дрожжей ресуспендировали в 1-5 мл сорбитола, разделяли на аликвоты по 40-80 мкл и использовали для трансформации, либо замораживали и хранили при -80°C.

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

Для проведения электропорации фасовку компетентных клеток размораживали на льду и смешивали с 0.5-1.5 мкг плазмиды, линеаризованной по сайту рестриктазы FastDigest AvrII (XmaII), или FastDigest BsmBI (Esp3I), или FastDigest SapI (LglI) и очищенной от солей. Суспензию клеток инкубировали 5-7 мин на льду и затем переносили в кюветы для электропорации с зазором 0.2 см (Eppendorf) и подвергали электропорации на приборе MicroPulser (Bio-Rad) по стандартному протоколу для *P. pastoris*. После электропорации в кювету добавляли 1 мл сорбитола (1 M), 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 мин при 30°C. После этого суспензию высевали на чашки с агаризованной YPD и селективным антибиотиком, инкубировали 48-36 ч. Для отбора положительных клонов *P. pastoris*, использовали селективные антибиотики в следующих концентрациях: зеоцин (Invivogen) – 100 мкг/мл, G418 (Formedium) – 250 мкг/мл, гигромицин В (Formedium) – 300 мкг/мл. Для каждой трансформации получали 3-5 биологических повторностей и вводили их в музей, ресуспендируя биомассу дрожжей в 15% глицерине, хранили на -80°C. Список созданных линий приведен в таблице 4 (Приложение).

### **2.2.4 Генотипирование линий дрожжей**

Генотипирование дрожжей для ряда полученных линий проводили с помощью ПЦР без выделения геномной ДНК. Для этого вначале ресуспендировали дрожжевую биомассу в 20 mM растворе NaOH и инкубировали 15 мин при 98°C. Затем 1 мкл данной смеси брали в качестве матрицы для реакции ПЦР с Encyclo PCR Kit или

Screen Mix Kit (Евроген) с использованием праймеров специфичных к анализируемым последовательностям генов, а также гена АСТ1 в качестве контроля.

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

Биомассу отдельного клона дрожжей переносили в 100 мкл 1 М сорбитола. Далее 5-10 мкл дрожжевой суспензии переносили на чашку с агаризованной 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 – 10 мкл кофейной кислоты (220 мМ в 40% ДМСО, PBS) и проводили имиджинг с помощью Fusion-Pulse.7 (Vilber Lourmat) в режиме серийной съемки с экспозицией 0.5 с и частотой 1 кадр в 5 мин.

Для некоторых экспериментов субстрат был заранее добавлен в агаризованную среду YPD до конечной концентрации 10 мкМ или 100 мкМ для ПКС растений и 1-16 мМ для ПКС из небиолюминесцентных грибов. На такие чашки также добавляли 5-10 мкл суспензии дрожжей в 1 М сорбитоле до высыхания и инкубировали при 30°C на 24 часа. Выросшие дрожжи фотографировали с помощью имаджера Fusion Pulse.7 с экспозицией 7 мин (в случае 10 мкМ кофейной кислоты) или 1 мин (в случае 100 мкМ кофейной кислоты) в случае ПКС из растений и с экспозицией 30 мин для ПКС небиолюминесцентных грибов.

Анализ изображений проводили с помощью дистрибутива Fiji ImageJ (версия 1.53t) (Schindelin и др., 2012) и пользовательских скриптов Python (версия Python 3.8). Для количественной оценки люминесценции использовали средние значения в интересующей области после вычитания фона.

### **2.2.6 Анализ спектров дрожжей при добавлении аналогов кофейной кислоты**

Дрожжи выращивали в форме круглых колоний при 30°C в течение 24 часов, как и в случае drop-test, на агаризованной среде YPD с добавлением субстратов: кофейной, феруловой и кумаровой кислот в концентрациях 1-10 мМ или их сочетании. Спектры люминесценции дрожжей анализировали, ресуспендируя биомассу дрожжей в буфере PBS, с помощью имидж-сканера TECAN Spark в диапазоне 398-653 нм. Нормировку спектров проводили на значения максимума.

### 2.2.7 Сравнение биолюминесцентных систем в клетках дрожжей

Для экспериментов по сравнению гибридной биолюминесцентной системы и описанных ранее люциферин-люциферазных реакций были собраны вектора, несущие гены люциферазы светлячка FFLuc и nanoLuc под контролем промотора pGAP и терминатора tAOX с помощью метода MoClo. Для селективного отбора колоний использовали кассету устойчивости к зеоцину, встроенную в каркас целевого вектора.

Далее этими векторами трансформировали дрожжи *P. pastoris GS115* дикого типа по протоколу, описанному выше. Так было получено по 5 биологических повторностей для каждой трансформации с FFLuc и nanoLuc. После получения, эти линии дрожжей были введены в музей в 15% растворе глицерина и хранились так на  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения эксперимента. Для сравнения все интересующие линии были выведены из музея одновременно.

Анализ проводили в формате 96 луночного планшета, в каждой лунке которого было добавлено 100 мкл агаризованной среды YPD. После ее застывания в каждую лунку добавляли 20 мкл ресуспендированной биомассы дрожжей в 1 М сорбитоле. Затем планшет инкубировали при  $30^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов. К выросшим за это время дрожжам добавляли субстрат: 100 мкМ кофейной кислоты в PBS для гибридной биолюминесцентной системы, 100 мкМ раствора D-люциферина (LUCK-100, GoldBio) в PBS для люциферазы светлячка и раствор субстрата Nano-Glo Live Cell (N2011, Promega) для nanoluc. Планшет снимали в TECAN Spark при экспозиции 0.1 с в течение 60 мин. Обработка данных выполнялась с использованием пользовательских скриптов Python.

## 2.3 Методы работы с культурами клеток млекопитающих HEK293NT

### 2.3.1 Ведение культуры клеток млекопитающих HEK293NT

Культуру клеток млекопитающих HEK293NT выращивали в стерильных культуральных флаконах площадью  $25\text{ cm}^2$  в 7 мл среды full DMEM (DMEM (ПанЭко) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина) в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  (Sanyo). Пересев производили каждые 2-3 дня по достижении клетками плотности 70-100 % монослоя. Для этого старую среду отбирали, однократно промывали монослой клеток смесью Трипсин-Версен (1:1). Затем его добавляли 1 мл на клетки и инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  1-5 мин до полного открепления клеток от поверхности. Далее ресуспендировали

содержимое пипетированием до гомогенного состояния и отделения клеток друг от друга, небольшую часть отбирали в новый культуральный матрас или чашку со свежей средой full DMEM, осторожно перемешивали и переносили в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### 2.3.2 Трансфекция клеток млекопитающих HEK293NT

Клетки млекопитающих линии HEK293NT трансфицировали с помощью трансфекционного реагента PolyFect (Qiagen) по инструкции производителя. Для трансфекции клетки культивировали в среде full DMEM в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C до плотности приблизительно 50-70% от монослоя. Смесь плазмид для трансфекции содержала по 150 нг каждой плазмиды, кодирующей nnLuz, nnH3N, 4CL и ПКС. Образцы контрольных клеток трансфицировали 150 нг плазмиды, кодирующей nnLuz и nnH3N, 110 нг плазмиды, кодирующей NrgA (молярный эквивалент 150 нг плазмиды, кодирующей 4CL), и 280 нг плазмиды, кодирующей nnHisps (молярный эквивалент 150 нг плазмиды, кодирующей ПКС). 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. Сравнение сигнала биолуминесценции клеток с разными ПКС проводили через 24 часа после трансфекции. Среду DMEM меняли на 150 мкл DPBS и добавляли раствор кофейной кислоты до достижения конечной концентрации 32.5 мкМ и 325 мкМ в лунке.

Съемку образцов проводили на IVIS Spectrum (PerkinElmer) с детектированием биолуминесценции с открытым фильтром, временем экспозиции 1 мин, binning 8, длительность съемки составляла 20 мин. Анализ изображений проводился с использованием программного обеспечения Living Image 4.5.5 и пользовательских скриптов Python. Для количественной оценки люминесценции мы использовали общий поток фотонов/с, нормированный по среднему значению контрольного образца, экспрессирующего nnHisps, с вычитанием фоновых значений.

## 2.4 Методы работы с культурами клеток BY-2

### 2.4.1 Культивирование клеток BY-2

Суспензия клеток *Nicotiana tabacum* BY-2 была любезно предоставлена группой проф. Яна Петрашека. Культуру выращивали в среде MS (Murashige Skoog medium) с добавлением 0.2 мг/л 2,4-D, 200 мг/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 мг/л тиамина, 100 мг/л мио-инозитола и 30 г/л сахарозы. с 30 г/л сахарозы на ротационной шейкере при 130 об/мин в темноте при 27°C.

### 2.4.2 Постановка временной трансформации клеток BY-2 в формате 96-луночного планшета

Для временной экспрессии генов использовали 7-дневную культуру. Протокол был адаптирован из (Rademacher и др., 2019). Клеточную суспензию аликвотировали в лунки 96-луночных планшетов с круглым перфорированным дном. Ночную культуру агробактерий ресуспендировали в инфльтрационном буфере (среда MS, 200 мкМ ацетосирингона, 15 мМ MES, pH 5.6, 50 г/л сахарозы, 2 г/л глюкозы),  $\text{OD}_{600}$  доводили до 0.5 единиц (до 0.2 единиц в случае P19). К каждой лунке с BY-2 добавляли смесь агробактерий и инкубировали 1 ч при 25°C в темноте. После удаления агробактерий центрифугированием чашки инкубировали в темноте в течение нескольких дней при комнатной температуре.

Анализ плашки с BY-2 проводили через 50-72 ч после трансформации агробактериями с использованием люминесцентного модуля TECAN Spark, время экспозиции 1 с, измеренное с открытым фильтром. Обработка данных выполнялась с использованием пользовательских скриптов Python. Для количественного определения люминесценции использовали значения в лунках планшета.

### 2.4.3 Сравнение биолюминесцентных систем

Для сравнения биолюминесцентных систем были собраны вектора, несущие гены люциферазы светлячка FFLuc и nanoLuc под контролем промотора 35s и терминатора tOCS (MoClo plant parts kit). Полученными векторами осуществляли трансформацию электропорацией агробактерий.

Трансформацию клеток BY-2 осуществляли полученными штаммами агробактерий по протоколу описанному выше. Через 50 часов после инфльтрации в клетки BY-2 добавляли 150 мкл среды MS (M5524, Sigma-Aldrich; pH = 5.7),

содержащей 100 мкМ D-люциферина (LUCK-100, GoldBio) в случае FFLuc, и субстрат Nano-Glo Live Cell (набор N2011, Promega) в случае NanoLuc. В случае биолюминесцентной системы грибов и гибридной системы с ПКС свечение было автономным и субстрат не добавляли. Планшеты визуализировали в TECAN Spark с открытым фильтром при экспозиции 0.1 с в течение 60 мин. Обработка данных выполнялась с использованием пользовательских скриптов Python. Для количественного определения люминесценции использовали значения в лунках планшета.

## 2.5 Методы работы с *N. benthamiana*

### 2.5.1 Растительный материал *N. benthamiana*

Растения *in vitro* культивировали с использованием базальной среды MS (Murashige Skoog medium), дополненной 30 г/л сахарозой, 0.2 мг/л индолилуксусной кислотой и 8 г/л агара (pH 5.7). Для стабильной трансформации использовали листья трехнедельных растений *N. benthamiana in vitro*. Культуры *in vitro* вели при 25°C в условиях длинного дня (16 ч света/8 ч темноты).

Для инфильтрации агробактерий использовали 4-6-недельные растения, выращенные в почве при нейтральном режиме дневного освещения (12 ч света/12 ч темноты).

### 2.5.2 Агроинфильтрации в листья *N. benthamiana*

10 мл ночной культуры бактерий собирали центрифугированием (3500 g, 20 мин) и ресуспендировали в 10 мл буфера MMA (10 mM MES, pH 5.7, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ ацетосирингона). Культуры инкубировали в течение 3 часов при 27,5°C и 600 об/мин, а затем разводили до OD<sub>600</sub>=0.6. Агроинфильтрации производили на внутреннюю поверхность листа с помощью шприца без иглы объемом 1 мл. Чтобы подавить сайленсинг генов, мы совместно инфильтрировали агробактерии, кодирующие белок P19 (Voinnet и др., 2003), в количестве 25% бактериальной суспензии. Люминесценцию проверяли через 2-3 дня после инфильтрации в Fusion-Pulse.7 (Vilber Lourmat).

Анализ изображений проводился с использованием дистрибутива Fiji ImageJ и пользовательских скриптов Python. Для количественной оценки люминесценции использовали средние значения в интересующей области. Для агроинфильтраций в



стабильные линии сигнал нормализовали по среднему значению люминесценции листьев. Вычитание фона осуществляли по следующей формуле: сигнал = необработанный сигнал – среднее значение фона.

Для агроинфильтрации конструкций BeYDV и TMV OD<sub>600</sub> была 0.1 ед. В случае экспрессии BeYDV ингибитор сайленсинга P19 и связанные с репликацией белки Rep/RepA были разбавлены в соотношении 1:3, тогда как для TMV, они не были включены в агрокомбинацию. Образцы были собраны на 2-й день после инфильтрации и перенесены в белый 96-луночный микропланшет, заполненный жидкой средой 1/2 MS. Измерения люминесценции проводились до 5-го дня для BeYDV и до 7-го дня для TMV с использованием системы обнаружения GloMax®-Multi (Promega). Для получения изображений использовали цифровую камеру Sony ILCE 7S (выдержка 30 секунд, светочувствительность ISO 20000 и диафрагма 2.8).

### 2.5.3 Постановка стабильной трансформации NB000

Мы использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 для создания трансгенных растений. Агробактерии, несущие целевой вектор, культивировали на шейкере в течение ночи при 27.5°C в среде LB, дополненной 30 мкг/мл спектиномицина и рифампицина. Бактериальные культуры разводили в жидкой среде MS30 до OD<sub>600</sub>=0.4-0.6. Рассеченные листья *N. benthamiana* инкубировали с бактериальной культурой в течение 30 мин. Эксплантаты сушили на стерильной фильтровальной бумаге и помещали на фильтровальную бумагу, наложенную на твердую среду MS с 30 г/л сахарозы, 8 г/л агара, 1 мг/л 6-бензиламинопурина и 0.1 мг/л индолилуксусной кислоты. После 2 дней совместного культивирования при 25°C экспланты переносили в ту же среду MS, дополненную 500 мг/л цефотаксима и 75 мг/л канамицина. После 3 недель инкубации в темноте регенерирующие побеги разрезали и выращивали на среде для укоренения (MS и витамины, 30 г/л сахарозы, агар 8 г/л, индол-3-масляная кислота 0.3 мг/л, канамицин 75 мг/л).

### 2.5.4 Растворы для инъекции стабильных линий

#### Растворы метаболитов

Для экспериментов были приготовлены стоковые растворы кофейной и кумаровой кислот (Sigma-Aldrich, чистота ≥98.0%) концентрации 220 мМ в буфере ММА с 40% ДМСО. Менее концентрированные растворы (1 мМ, 0.01 мМ, 0.0001 мМ)

готовили разбавлением исходных растворов в буфере MMA. Исходные растворы 4 мМ гиспицина и 2 мМ люциферина в ДМСО готовили непосредственно перед каждым экспериментом и далее растворяли до конечной концентрации в буфере MMA.

### Раствор MG132

MG132 (Abcam) (Proteasome Inhibitor (CAS 133407-82-6) (ab147047)) растворяли в этаноле до 10 мМ исходного раствора. Экспериментальные растворы с концентрацией 1 мкМ и 40 мкМ готовили в буфере MMA.

## **2.6 ВЭЖХ-МС/МС анализ**

### **2.6.1 Приготовление образцов дрожжей**

Дрожжевые колонии выращивали на агаризованной среде YPD с 10 мМ кофейной кислоты или без нее при 30°C. Через 48 часов биомассу из всех образцов перемещали в пробирки на 2 мл и трижды промывали mQ. К дрожжевым осадкам в каждой пробирке добавляли около 100 мг стеклянных шариков и 1 мл 70% метанола. Образцы обрабатывали гомогенизатором с шаровой мельницей при 13 000 об/мин в течение 10 мин, затем центрифугировали 10 мин при 13 000 об/мин. 700 мкл супернатанта переносили в другую пробирку и лиофилизировали при помощи концентратора miVac (Genevac). Перед анализом сухие осадки растворяли в 100 мкл 20% ацетонитрила (J.T.Baker), подкисленном 0.1% муравьиной кислотой и центрифугировали при 13000 об/мин для удаления нерастворимого осадка. Супернатанты переносили во флаконы для ВЭЖХ и анализировали.

### **2.6.2 Режим съемки образцов дрожжей**

ВЭЖХ-МС/МС анализ проводили на системе Ultimate 3000 RSLCnano HPLC, соединенной с масс-спектрометром Orbitrap Fusion Lumos (ThermoFisher Scientific, USA). Разделение аналита проводили на колонке Agilent Eclipse Plus C8 3.5 мкм 2.1x150 мм при скорости потока 200 мкл/мин с использованием линейного градиента 90% ацетонитрила, 0.1% муравьиной кислоты, 10 мМ формиата аммония (буфер В) в 99.9% H<sub>2</sub>O, 0.1% муравьиной кислоты (буфер А) от 3 до 95% В за 10 мин. Данные МС собирали в режиме отрицательных ионов. Спектры MS1 и MS2 записывались с разрешением 30К и 15К соответственно с HCD фрагментацией. Идентификацию компонентов осуществляли по точной массе ионов и совпадению времени

удерживания компонента и его аналитических стандартов. Необработанные данные были собраны и обработаны с помощью программного обеспечения Thermo Xcalibur Qual и Skyline. Для количественного определения соединения использовали соответствующую площадь пика для каждого образца. Анализ проводился с использованием пользовательских скриптов Python.

### 2.6.3 Приготовление образцов растений

Образцы растений для ВЭЖХ-МС/МС готовили из листьев *N. benthamiana*, которые трансформировали путем инфильтрации смесью штаммов агробактерий, кодирующих различные комбинации отдельных единиц транскрипции (PrASCL, nnHispS, NpgA, EGFP, nnH3H). Через 48 часов после инфильтрации листа гомогенизировали в жидком азоте и лиофилизировали. Экстракты получали из 50 мг сухой растительной биомассы с использованием 2 мл 70% метанола. Экстракты затем фильтровали через 0.45 мкм фильтр GF/PVDF (Phenex) и лиофилизировали в вакуумном концентраторе miVac (Genevac). Сухие остатки растворяли в 200 мкл 70% метанола путем вортексирования и переносили во флаконы для ВЭЖХ для анализа.

### 2.6.4 Режим съемки образцов растений

ВЭЖХ-МС/МС анализ проводили на системе Ultimate 3000 RSLCnano HPLC, соединенной с масс-спектрометром QExactive Plus (Thermo Fisher Scientific, США). Разделение аналита проводили на колонке Gemini C18 3.5 мкм NX LC 100x2.1 мм (Phenomenex) при скорости потока 200 мкл/мин с использованием линейного градиента 90% ацетонитрила в воде, 10 mM формиата аммония, 0.1% муравьиной кислоты (буфер В) в 99.9% H<sub>2</sub>O, 10 mM формиата аммония, 0.1% муравьиной кислоты (буфер А): 1% В при 0 мин, 50% В через 3 мин, 99% В через 8 мин, с последующей 3-минутной промывкой при 99% В и 2-минутным уравниванием при 1% В. УФ-данные собирали при 220 нм. Спектры MS1 и MS2 записывались с разрешением 30K и 15K соответственно с HCD фрагментацией.

## 2.7 Представление данных и статистика

Данные представлены в виде диаграмм типа «ящик с усами» (box-and-whiskers), построенных с помощью пакета Seaborn (<https://seaborn.pydata.org/>, версия 0.12, Python версии 3.8). Границы бокса

соответствуют верхнему и нижнему квартильным значениям данных, горизонтальная линия отмечает медиану, а «усы» представляют полный диапазон данных. Разница между средними значениями указана скобками между диаграммами (для некоторых рисунков). Цвет точек на графиках, если он не серый, указывает на разные линии растений. Статистическая достоверность различий между образцами определялась с использованием попарного апостериорного U-теста Манна-Уитни с коррекцией значений  $p$  по методу Сиджака. В случае большого количества сравниваемых образцов использовался H-тест Краскела-Уоллиса, сопровождаемый (в случае отвержения гипотезы  $H_0$ ) множественным попарным апостериорным двусторонним тестом Коновера с коррекцией значений  $p$  по методу Сиджака. Статистические расчеты осуществлялись с использованием пакетов `scipy.stats` (<https://www.scipy.org/>, версия 1.9.2) и `scikit-posthocs` (<https://pypi.org/project/scikit-posthocs/>, версия 0.7.0).

Рис.15 и 18.  $N = 9$ .

Рис.22 (Б).  $N = 3-18$ . H-тест Краскела-Уоллиса:  $H = 88.25$ ,  $p = 3.7e-14$ .

Рис.23 (А).  $N = 9$ . H-тест Краскела-Уоллиса:  $H = 28.97$ ,  $p = 2.3e-6$

Рис.24.  $N = 9-34$ . H-тест Краскела-Уоллиса:  $H = 133.08$ ,  $p = 5.1e-22$  (А) или  $H = 155.89$ ,  $p = 1.3e-26$  (Б), H-статистика = 98.41,  $p = 3.3e-15$  (Г).

Рис.26 (А).  $N = 4-9$ . Разница между средними значениями и  $p$ -значениями post-hoc тестов Коновера указана под скобками между диаграммами.

Рис.27.  $N = 9$ . H-тест Краскела-Уоллиса:  $H = 557.74$ ,  $p = 3.0e-116$  (А) или  $H = 588.02$ ,  $p = 9.3e-123$  (Б).

Рис.28.  $N = 9$ . H-тест Краскела-Уоллиса:  $H = 271.49$ ,  $p = 1.5e-57$  (А) или  $H = 188.04$ ,  $p = 1.4e-39$  (Б).

Рис.29.  $N = 10$ . H-тест Краскела-Уоллиса:  $H = 157.0$ ,  $p = 9.7e-26$ .

Рис.30.  $N = 8$ .

Рис.31.  $N = 4-20$ . H-тест Краскела-Уоллиса:  $H = 111.89$ ,  $p = 2.4e-17$ .

Рис.32 (А).  $N = 3$ . Разница между средними значениями и  $p$ -значениями post-hoc тестов Коновера указана под скобками между диаграммами.

Рис.33.  $N = 3$ . H-тест Краскела-Уоллиса:  $H = 8.18$ ,  $p = 0.15$  (А),  $H = 7.57$ ,  $p = 0.18$  (Б), H-статистика = 15.76,  $p = 7.6e-3$  (В).

Рис.34.  $N = 3$ . Планки погрешностей указывают SD.

Рис.37.  $N = 4-16$ . Значения  $p$  апостериорного теста Коновера указаны рядом со скобками между диаграммами размаха (\*\*\*\* -  $p \leq 0.0001$ , \*\*\* -  $0.0001 < p \leq 0.001$ , \*\* -  $0.001 < p \leq 0.01$ , \* -  $0.01 < p \leq 0.05$ , NS (незначимо) -  $0.05 < p$ ).

Рис.38. N = 4-20. Значения p апостериорного U-теста Манна-Уитни указаны над скобками между диаграммами.

Рис.39. N = 3-6.

Кинетики биолюминесценции на рис.22, 23, 24, 26, 32 представлены как среднее значение  $\pm$  SD.

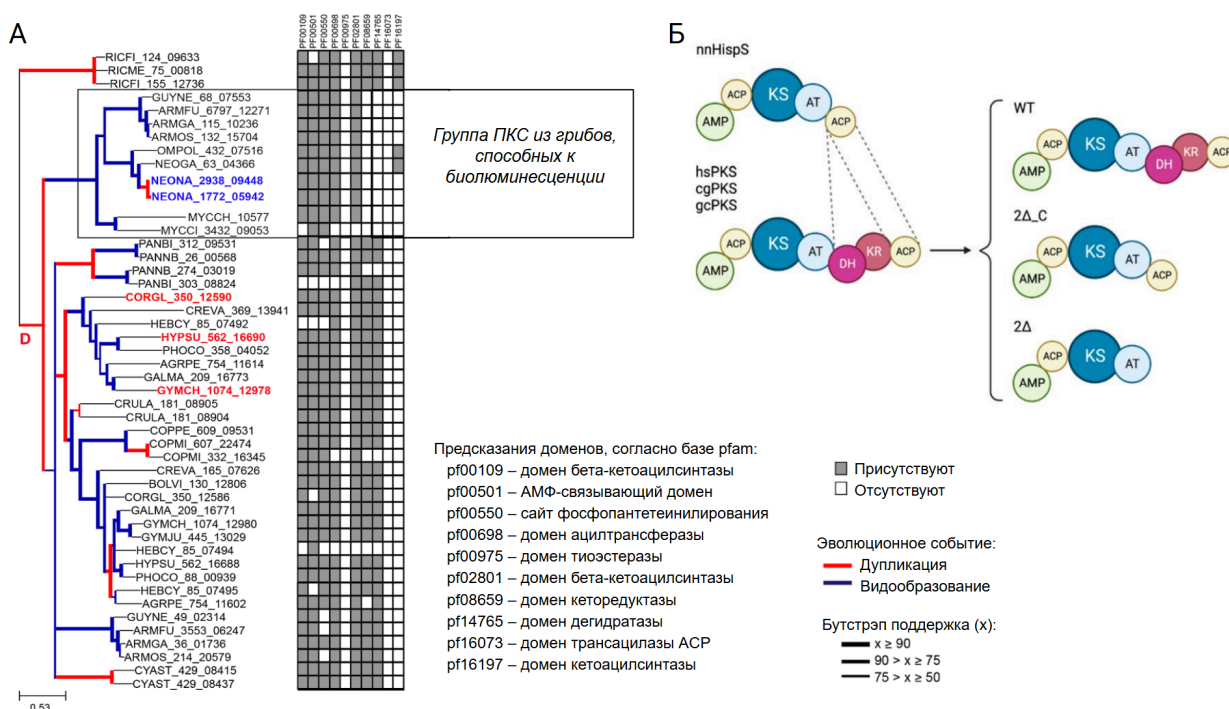
## Глава 3. Результаты и их обсуждение

### 3.1 Поиск новых ферментов биосинтеза гиспидина среди PKS небиоллюминесцентных грибов

Ранее в нашей лаборатории в ходе работ по расшифровке механизма биоллюминесценции высших грибов (Kotlobay и др., 2018) был проведен биоинформатический анализ геномов биоллюминесцентных и родственных небиллюминесцентных базидиомицетов порядка *Agaricales*. Так были обнаружены PKS грибов, относящиеся, предположительно, к итеративным PKS I типа или гибридным ферментам PKS-NRPS. С помощью базы данных белковых доменов Pfam были предсказаны домены, которые входят в состав найденных ферментов PKS, а также построено филогенетическое дерево (рис.14 А). Согласно этим данным, PKS биоллюминесцентных грибов образуют отдельную группу, которая отличается по доменной организации и состоит из пяти доменов: АМР-связывающего (AMP), кетосинтазного (KS), ацилтрансферазного (AT) и двух доменов ацилпереносающего белка (ACP). Стоит отметить, что в них отсутствовали кеторедуктазный (KR) и дегидратазный (DH) домены, характерные для некоторых PKS грибов (рис.14). Предполагается, что такие особенности архитектуры PKS важны для эволюционного отделения этой группы ферментов, а также способствовали изменению механизма реакции, что привело к биосинтезу гиспидина, предшественника люциферина грибов, в качестве основного или одного из основных продуктов. Возможно, это событие, наравне с образованием и перестроением кластера генов люциферазы (Ke и др., 2020), стало решающим в появлении биоллюминесценции около 160 млн лет назад.

Для проверки этой гипотезы были выбраны три PKS грибов, не обладающих способностью светиться. В составе выбранных PKS было семь доменов, включая кеторедуктазный и дегидратазный, а также они относились к группе, наиболее близкой к PKS биоллюминесцентных грибов, способных производить гиспидин. Для анализа взяли гены PKS из паутинника сизоножкового *Cortinarius glaucopus* (cgPKS), ложноопенка кирпично-красного *Hypholoma sublateritium* (hsPKS) и представителя рода огневок *Gymnopilus chrysopellus* (gcPKS). Филогенетический анализ родственных биоллюминесцентных и небиллюминесцентных грибов, разделившихся еще в юрском периоде, показал, что у *Hypholoma sublateritium* произошло возникновение генов PKS и кафеоилпируватгидролазы (CPH), без возникновения генов люциферазы (Luz) и гиспидин-3-гидроксилазы (H3H), что связано с отсутствием свечения у данного вида

(Ке и др., 2020). Аналогично для *Cortinarius glaucopus* удалось установить наличие генов СРН и ПКС, а также отсутствие генов НЗН и Luz в геноме. Границы доменов ПКС были предсказаны с помощью алгоритма HMMER (Wheeler и Eddy, 2013). Для отобранных ПКС С-концевой домен был гомологичен домену на С-конце nnHisps из *N.nambi*, поэтому было решено создать несколько версий ПКС с отсутствующими доменами. Так, С-концевые домены отсутствовали либо полностью ( $\Delta 2$ ), либо частично ( $\Delta 2\_C$ ) (см.рис.14 Б).



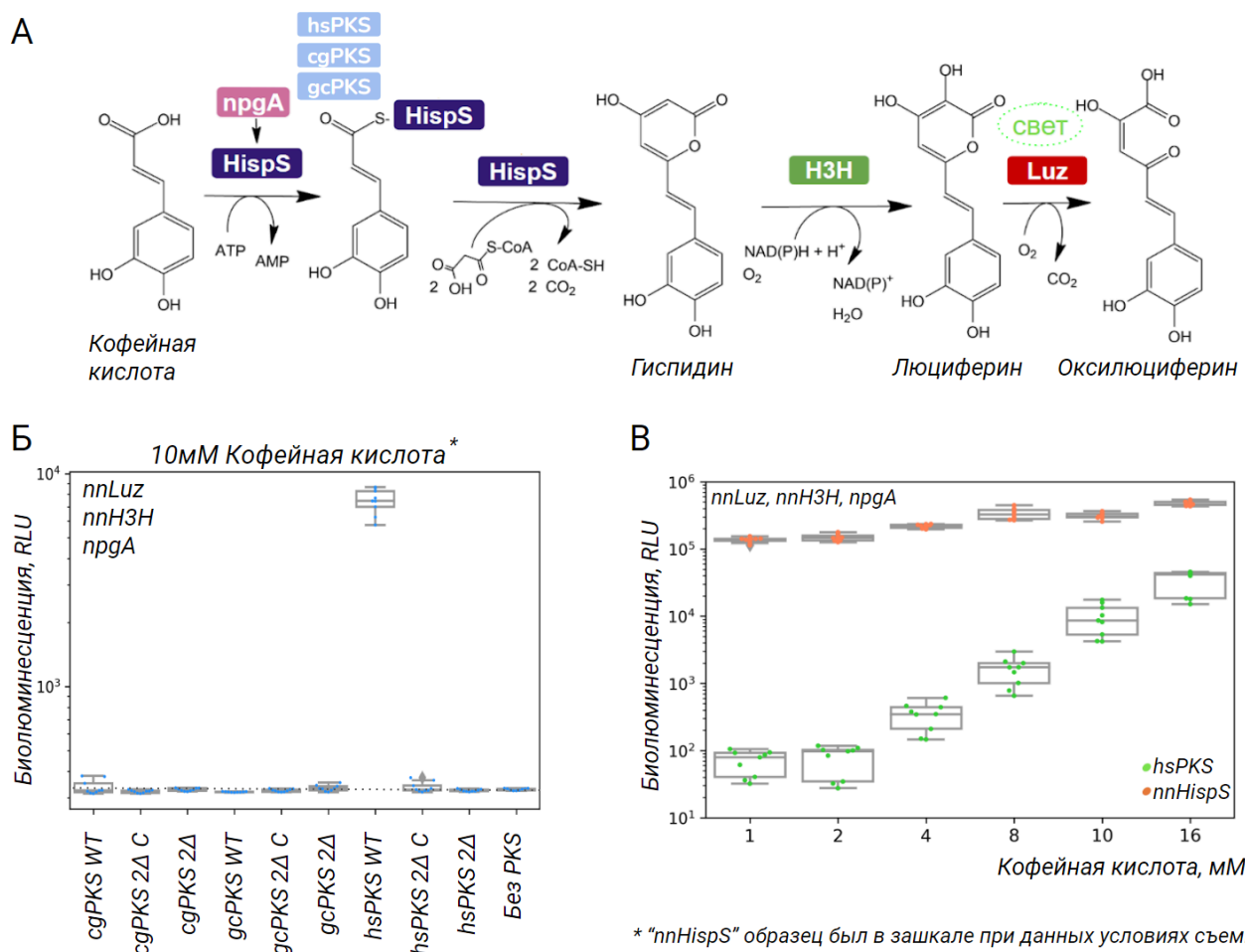
**Рисунок 14.** Адаптировано из (Palkina и др., 2023). А) Организация доменов поликетидсинтаз у биолюминесцентных (отмечено прямоугольником) и небиолюминесцентных грибов. Гены, выбранные для анализа делеции домена, показаны красным, nnHisps показан синим цветом. Б) Схематическое изображение доменов ПКС грибов: *Cortinarius glaucopus* (cgPKS), *Hypholoma sublateritium* (hsPKS) и *Gymnopilus chrysopellus* (gcPKS). WT – нативная доменная организация и усеченных версии:  $2\Delta$  – вариант ПКС с удаленными доменами дегидратазы, кеторедуктазы и С-концевого АСР,  $2\Delta\_C$  – вариант фермента, в котором были удалены только домены дегидратазы и кеторедуктазы. KS – кетосинтазный домен, АТ – ацилтрансферазный домен, АСР – ацилпереносающий белок, АМР – АМР-связывающий домен, КР – кеторедуктазный домен, ДН – дегидратазный домен.

### 3.2 Анализ функционирования cgPKS, hsPKS, gcPKS и их мутантных форм в клетках дрожжей

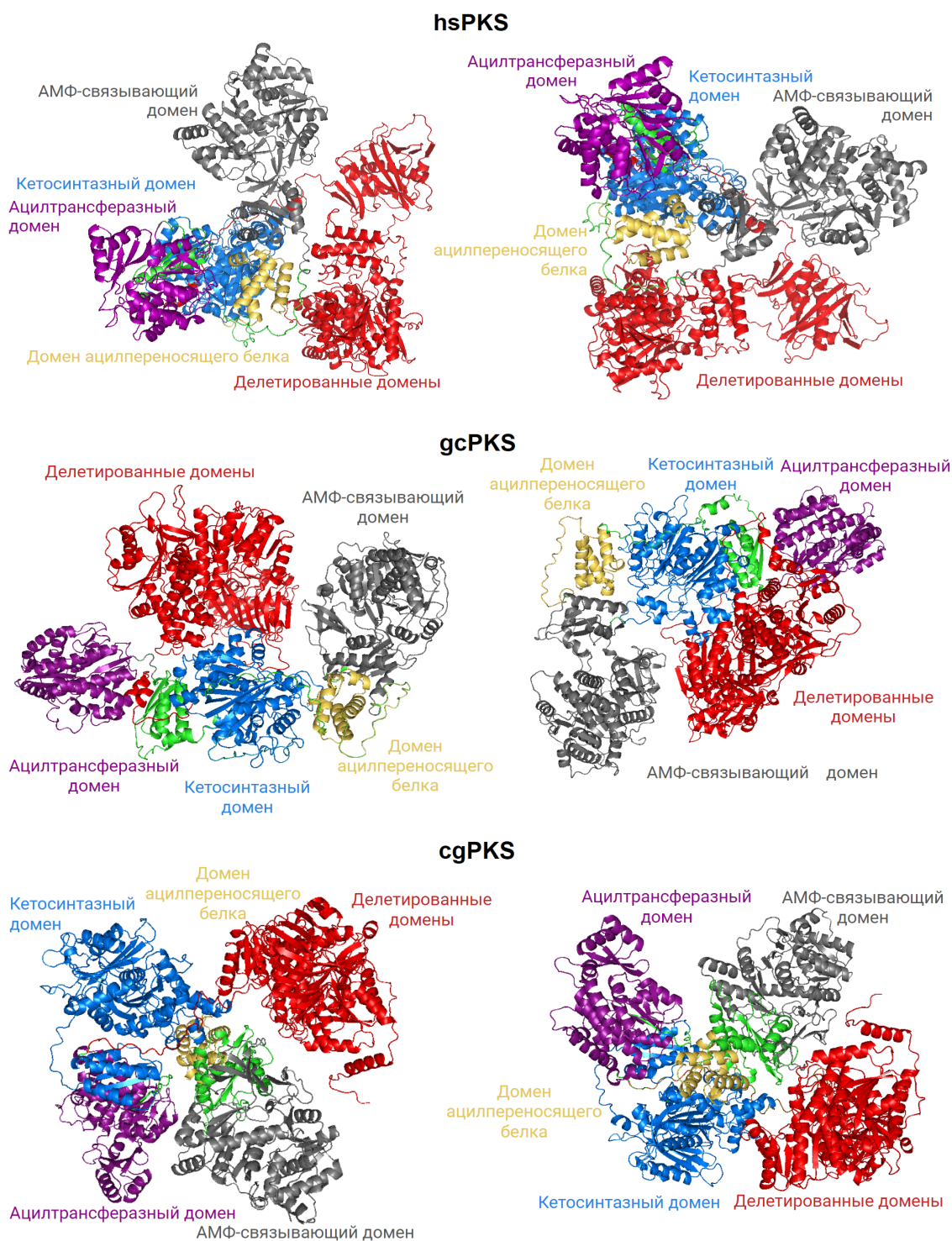
Анализ функционирования ПКС небиолюминесцентных грибов проводили в клетках дрожжей *Pichia pastoris* GS115. Для этого были созданы стабильные линии, в которых гены ферментов биолюминесцентной системы *N.nambi*: люциферазы (nnLuz) и гиспидин-3-гидроксилазы (nnH3H) – экспрессировались совместно с полноразмерными и укороченными версиями cgPKS, hsPKS, gcPKS. Кроме того, данные линии экспрессировали ген вспомогательного фермента, осуществляющего фосфопантетеинилирование из *Aspergillus nidulans* (NpgA), необходимого для работы грибных ПКС (Shakhova и др., 2024). В качестве контроля была создана линия с аналогичным набором генов ферментов и геном гиспидинсинтазы *N.nambi* (nnHispS). Все эти линии были генотипированы и экспрессия гетерологических генов была оценена с помощью ПЦР в реальном времени.

Мы наблюдали тусклую биолюминесцию в ответ на добавление кофейной кислоты к колониям дрожжей, экспрессирующим полноразмерную версию hsPKS, что позволяет предположить продукцию гиспидина или близкого аналога (рис.15). Однако интенсивность сигнала была ниже контрольной линии с nnHispS на несколько порядков, что может свидетельствовать о том, что гиспидин или его аналог скорее всего является побочным продуктом. Для образцов с полноразмерными gcPKS и cgPKS, а также для укороченных версий cgPKS, hsPKS, gcPKS зарегистрировать биолюминесцентный сигнал не удалось. Это может быть вызвано рядом причин. Во-первых, удаление доменов могло нарушить фолдинг и пространственную организацию других доменов важных для катализа. Во-вторых, ПКС небиолюминесцентных грибов могут отличаться от nnHispS по своим субстратным предпочтениям и не утилизировать кофейную кислоту. В-третьих, возможно, механизм реакции, производимой данными ПКС и, как следствие, поликетидный продукт, отличается от nnHispS, и он не может быть утилизирован другими ферментами биолюминесцентного каскада *N.nambi*, в результате чего свечение отсутствует.





**Рисунок 15.** Анализ функционирования ПКС в клетках дрожжей А) Схема реакции биолюминесценции грибов: трансформация кофейной кислоты в оксилюциферин, производимая в клетках дрожжей отобранных для ВЭЖХ-МС/МС анализа. Luz – люцифераза, H3H – гиспидин-3-гидроксилаза, HispS – гиспидинсинтаза грибов, NpgA – фосфопантетеин-трансфераза. cgPKS – ПКС из *Cortinarius glaucopus*, hsPKS – ПКС из *Hypholoma sublateritium* и gcPKS – ПКС из *Gymnopilus chrysopellus* gcPKS. Адаптировано из (Kotlobay и др., 2018). Б) Люминесценция, излучаемая колониями дрожжей *Pichia Pastoris GS115*, экспрессирующими гены nnLuz, nnH3H, NpgA и полноразмерных поликетидсинтаз hsPKS, cgPKS, gcPKS при добавлении кофейной кислоты. В) Люминесценция, излучаемая колониями дрожжей *Pichia Pastoris GS115*, экспрессирующими гены nnLuz, nnH3H, NpgA и полноразмерной hsPKS (отмечено зеленым) или nnHispS (отмечено оранжевым), после обработки различными концентрациями кофейной кислоты.



**Рисунок 16.** Предсказание пространственной организации доменов PKS из *Hypholoma sublateritium* (hsPKS), из *Cortinarius glaucopus* (cgPKS), из *Gymnopilus chrysopellus* (gcPKS) с помощью AlphaFold 3.0 (Abramson и др., 2024). Границы, предсказанные с помощью алгоритма HMMER (Wheeler и Eddy, 2013), выделены цветом: AMP-связывающий домен отмечен серым, домен ацилпереносящего белка – желтым и зеленым, кетосинтазный домен – синим, ацилтрансферазный домен – фиолетовым, делетированные домены (кеторедуктазный и дегидратазный домены) – красным.

Биоинформатический анализ пространственной структуры крупных многодоменных белков долгое время оставался сложной задачей. Однако с появлением доступного онлайн сервиса AlphaFold 3.0 (Abramson и др., 2024) удалось предсказать пространственную структуру hsPKS, gcPKS, cgPKS. Границы, предсказанные с помощью алгоритма HMMER (Wheeler и Eddy, 2013), выделены цветом (рис.16). Любопытно, что представленные структуры hsPKS, gcPKS, cgPKS, отличаются между собой по расположению доменов друг относительно друга в пространстве. Согласно пространственной модели кеторедуктазный и дегидратазный домены, выбранные для удаления, структурно обособлены, однако границы предсказанные HMMER и выбранные нами для создания мутантных версий, не совпадают с предсказанной структурой AlphaFold 3.0 и отличаются на 10-20 аминокислот. Неверно выбранные границы для проведения мутагенеза могли привести к тому, что созданная версия фермента оказалась нерабочей и не приводила к свечению.

### **3.3 ВЭЖХ-МС/МС анализ дрожжей, экспрессирующих гены ферментов билюминесцентной системы с cgPKS, hsPKS, gcPKS**

С целью определить продукты полноразмерных cgPKS, hsPKS, gcPKS, которые могут образовываться из кофейной кислоты, мы провели ВЭЖХ-МС/МС анализ линий дрожжей, описанных выше, дополнительно экспрессирующих гены nnLuz, nnH3H, NpgA. В качестве контроля взяли дрожжи, экспрессирующие ген nnHispS совместно с другими генами билюминесцентной системы *N.nambi* nnLuz, nnH3H, NpgA. Анализ образцов проводили в присутствии и отсутствии кофейной кислоты в качестве субстрата.

В результате анализа выяснилось, что образцы с гиспидинсинтазой *N.nambi*, демонстрирующие свечение от кофейной кислоты, показали наличие гиспилина в пробах. При этом для образцов с hsPKS и cgPKS, gcPKS при добавлении кофейной кислоты гиспилина зарегистрировано не было (рис.17). 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.

Данная работа была проведена совместно с Ольгой Белозеровой (Лаборатория антибиотикорезистентности, ИБХ РАН) и Сергеем Ковальчуком (Лаборатория биоинформационных методов комбинаторной химии и биологии, ИБХ РАН).

Название образца	Наличие гиспидина в образце при добавлении кофейной кислоты	Свечение колоний при добавлении кофейной кислоты
<i>nnHisps, nrgA, H3H, Luz</i>	+	+
<i>hsPKS, nrgA, H3H, Luz</i>	–	+
<i>cgPKS, nrgA, H3H, Luz</i>	–	–
<i>gcPKS, nrgA, H3H, Luz</i>	–	–

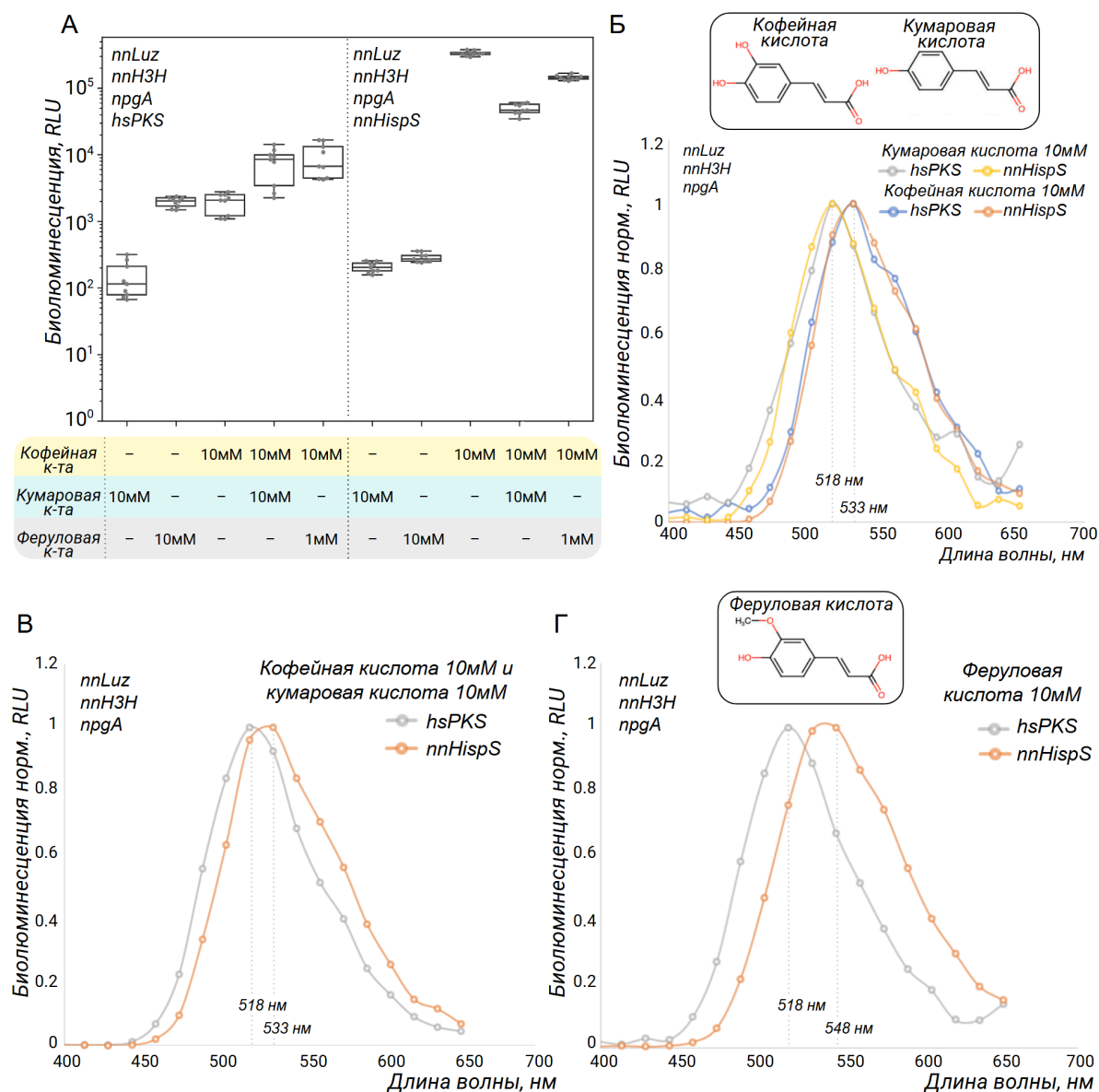
**Рисунок 17.** Результаты ВЭЖХ-МС/МС анализа линий дрожжей, экспрессирующих гены *Luz*, *H3H*, *nnHisps* или *cgPKS*, или *gcPKS*, или *hsPKS*, *NrgA*. «+» – гиспидин был обнаружен в образце (либо свечение аналогичных колоний при добавлении кофейной кислоты детектировано), «-» – гиспидин не был обнаружен в образце (либо свечение аналогичных колоний при добавлении кофейной кислоты не детектировано).

### 3.4 Взаимодействие *cgPKS*, *hsPKS*, *gcPKS* с аналогами кофейной кислоты

Существует предположение о том, что биолюминесценция грибов не ограничивается последовательной трансформацией кофейной кислоты в гиспидин, люциферин и оксилуциферин, а может использовать и другие субстраты для свечения. Так, ранее в работе Константина Пуртова было продемонстрировано, что аналог гиспидина – биснорьянгонин, который мог бы быть синтезирован ПКС из кумаровой кислоты, способен приводить к свечению (Purtov и др., 2015). Кроме того, работа Зинаиды Каськовой отмечает толерантность *Luz N.gardneri* к используемому субстрату и изменение спектра биолюминесценции в зависимости от структуры аналога люциферина (Kaskova и др., 2017). Поэтому в данной работе мы предположили, что слабое свечение или его отсутствие при добавлении кофейной кислоты может быть связано с тем, что ПКС предпочитают использовать другой субстрат. Таким образом, мы проанализировали свечение линий дрожжей с *cgPKS*, *hsPKS*, *gcPKS* при добавлении ряда фенольных кислот, близких аналогов кофейной кислоты: кумаровой и феруловой. В данной работе мы исследовали созданные на прошлых этапах линии дрожжей с полноразмерными версиями *cgPKS*, *hsPKS*, *gcPKS* и *nnHisps* в качестве референса.

Для *cgPKS* и *gcPKS* мы не наблюдали свечение при добавлении субстратов в концентрации 10 мМ, что свидетельствует о том, что данные ферменты не способны

продуцировать стирилпироны, приводящие к биолюминесценции. При этом дрожжи, экспрессирующие либо ген *hsPKS*, либо *nnHispS*, светились при добавлении как кумаровой, так и феруловой кислот, что говорит о широком субстратном предпочтении этих ферментов (рис.18 А).



**Рисунок 18.** А) Люминесценция колоний *P. pastoris*, экспрессирующих гены *nnLuz*, *nnH3H*, *NprgA* 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 биолюминесцентной системы грибов с *nnHispS* и *hsPKS* при добавлении кумаровой кислоты смещается в коротковолновую область относительно

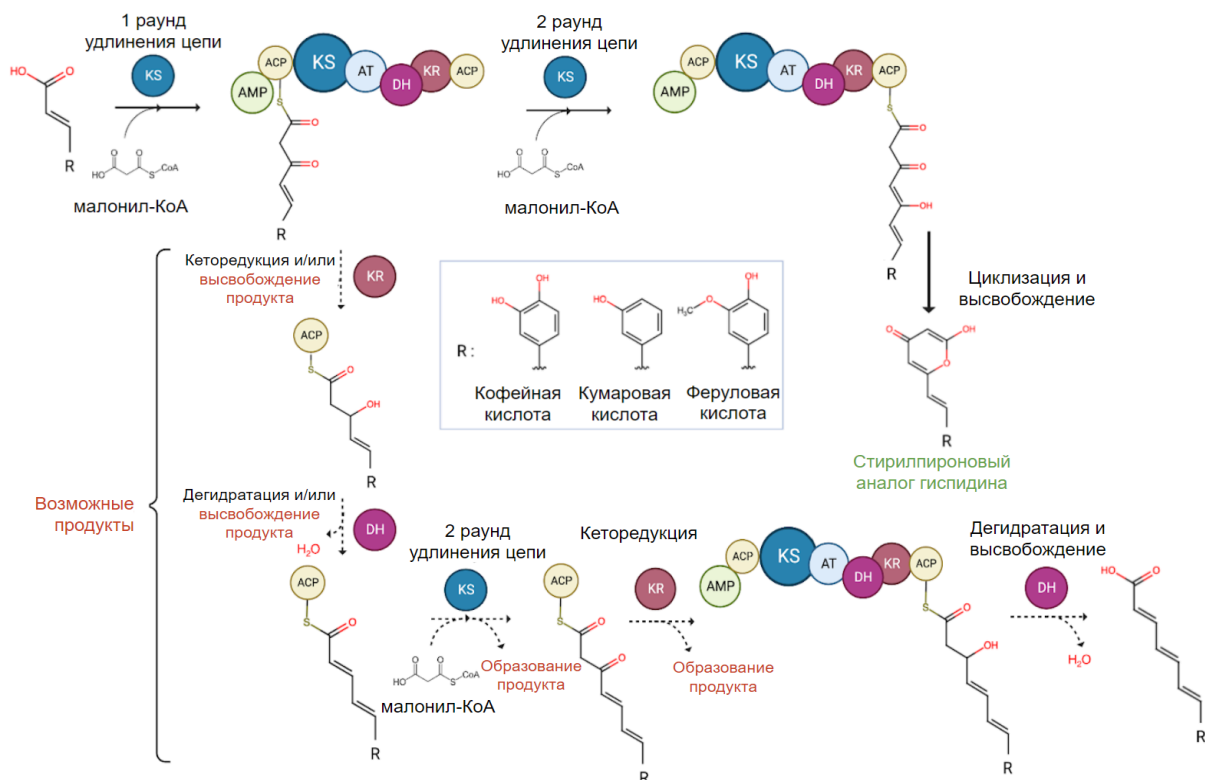
сигнала при добавлении кофейной кислоты (рис.18 Б). При этом при добавлении эквимольной смеси кофейной и кумаровой кислот для hsPKS мы также наблюдаем смещение спектра относительно nnHispS, что, вероятно, отражает предпочтение hsPKS кумаровой кислоты в смеси, в отличие от nnHispS, предпочитающей кофейную кислоту (рис.18 В).

Любопытно, что при добавлении феруловой кислоты к дрожжам спектры биолюминесценции для nnHispS и hsPKS заметно отличаются по положению максимума, что может отражать различную структуру продуктов, производимых этими ПКС из одного субстрата (рис.18 Г). В то же время, биолюминесценция от феруловой кислоты свидетельствует и о широкой субстратной специфичности ферментов Luz и H3H, способных утилизировать такие разные продукты ПКС. При концентрации феруловой и кофейной кислот в смеси по 10 мМ оба штамма дрожжей не выживали, тогда как контрольные штаммы, лишённые ПКС, росли нормально. Этот результат предполагает потенциальную токсичность комбинации  $\alpha$ -пиронов, полученных из феруловой и/или кофейной кислот, синтезируемых этими ПКС.

Мы показали, что поликетидсинтаза из *Hypholoma sublateritium* способна продуцировать гиспидинподобные стирилпироны из кофейной, п-кумаровой и феруловой кислот, однако продукт ее реакции остается неуточненным. Хотя прогнозирование продуктов поликетидсинтазы I типа по их последовательности становится все более и более продвинутым (Blin и др., 2019; Khater и др., 2017; Minami и др., 2020; Zieger и др., 2020), ни один из протестированных нами опубликованных инструментов не смог предсказать гиспидин в качестве продукта nnHispS. Тем не менее, мы попытались рационально рассмотреть продукты реакций, hsPKS (рис.19) на основе существующих данных о катализе поликетидсинтазой I типа (Nivina и др., 2019).

Известно, что дегидратазный домен создает  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные связи посредством реакции дегидратации (Y. Li и др., 2015), тогда как кеторедуктазный домен восстанавливает  $\beta$ -кетон в спирт с помощью НАДФН (H. Zhou и др., 2012). Следует отметить, что последовательность доменов ПКС не обязательно отражает порядок соответствующих катализируемых химических превращений. Как мы предполагаем, hsPKS способен продуцировать гиспидинподобный стирилпирон в качестве побочного продукта, учитывая наблюдаемую тусклую люминесценцию. Это может быть достигнуто за счет двух циклов элонгации, подобных катализируемым nnHispS. Вместе с этим образование основных продуктов может потребовать более



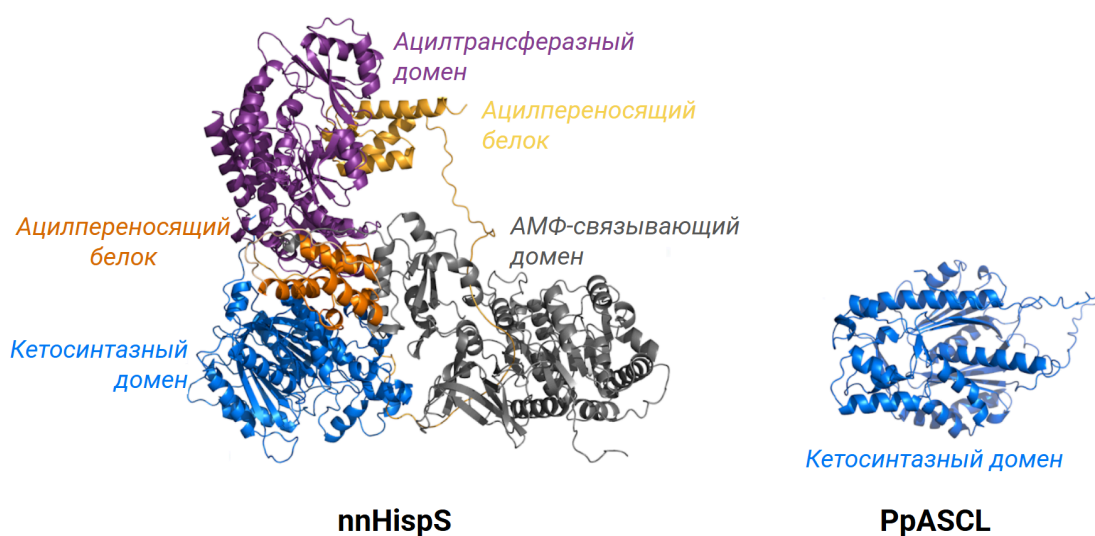


Полученные данные согласуются с гипотезой о широком субстратном предпочтении ПКС и ферментов биолюминесцентной системы грибов. Мы показали способность поликетидсинтазы из небиолюминесцентного гриба *Hypholoma sublateritium* hsPKS совместно с другими генами ферментов биолюминесцентной системы грибов приводить к свечению с использованием различных субстратов, предположили пространственную структуру hsPKS, используя доступные инструменты предсказания, но подтвердить производство гиспидина штаммом с hsPKS методом ВЭЖХ/МС не удалось. Удаление 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.

### 3.5 Поиск новых генов биосинтеза гиспидина из кофейной кислоты

Сокращение размера генетической конструкции, кодирующей биолуминесцентную систему грибов, сделает ее более удобной для биотехнологических приложений и расширит ее использование в научных исследованиях. Гиспидинсинтаза грибов является наиболее крупным ферментом в этой системе – размер гена nnHispS составляет 5.1 кб. Так, 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 доставляемой конструкции снижает эффективность репликации (Suárez-López и Gutiérrez, 1997; M. Wang и др., 2017). Также большой размер затрудняет доставку аденоассоциированными вирусами для экспрессии в животных системах (J. Y. Dong и др., 1996; C. L. Xu и др., 2019). Таким образом, поиск эффективных и компактных гиспидинсинтаз среди ПКС является актуальной задачей.

Среди ПКС наиболее оптимальны ферменты III типа, которые хорошо изучены в растениях. Они имеют меньший размер по сравнению с ПКС грибов (рис.20) и не требуют дополнительных посттрансляционных модификаций для своей работы. Мы выбрали набор генов ПКС III типа для дальнейшего тестирования на основе анализа данных литературы, транскриптомов, и биоинформатического поиска в публичных базах данных нуклеотидных последовательностей.



**Рисунок 20.** Белковые структуры nnHispS и растительной поликетидсинтазы III типа (PpASCL), предсказанные AlphaFold 2.0 (Cramer, 2021).



Прежде всего, в анализ были взяты ферменты, способные производить гиспидин по данным литературы – из перца опьяняющего *Piper methysticum* (PmSPS1, PmSPS2) (Pluskal и др., 2019). Также, мы обратили внимание, что в 1997 году Беккерт и его коллеги сообщили об активности гиспидинсинтазы в экстрактах хвоща *Equisetum arvense*, но не идентифицировали соответствующий ген (Beckert и др., 1997). Поэтому для нашей работы мы анализировали транскриптом хвоща и выбрали 4 кандидата ПКС из этого растения.

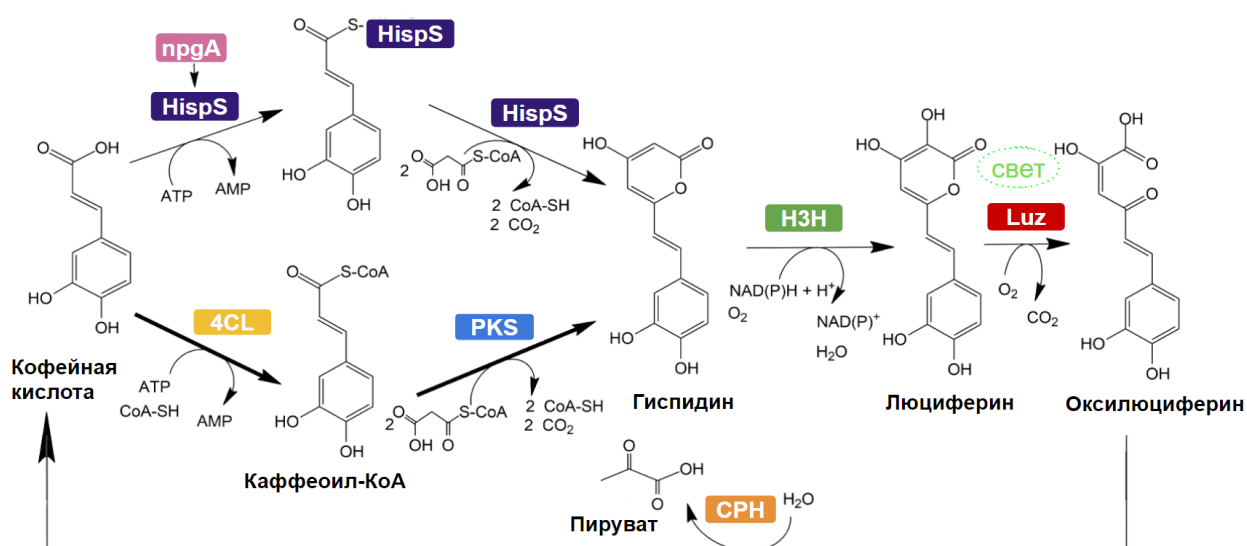
Наконец, опубликованные исследования показали, что ПКС растений способны синтезировать стирилпироны, которые структурно близки к гиспидину (Bisht и др., 2021; Thapa и др., 2019). В связи с широкой субстратной специфичностью ПКС и их способностью производить поликетиды различных структур, за счет разных способов циклизации интермедиата и дополнительных модификаций, поиск гиспидинсинтаз проводили среди этой группы ферментов. Данные литературы позволили отобрать кандидаты-ПКС, которые могут катализировать образование аналога гиспидина, такого как биснорьянгонин, из кумароил-КоА. Таким образом, финальный список включал в себя 21 ген ПКС (рис.21, табл.1, приложение табл. 1) из филогенетически разнообразных видов растений, включая мохообразные, хвощи, однодольные и двудольные.

В отличие от грибных ПКС I типа, субстратом ПКС III типа являются не свободные фенольные кислоты, а их КоА-производные, которые образуются в ходе реакции, катализируемой 4-кумароил-КоА-лигазой (4CL). Первоначальное сравнение ПКС III мы планировали провести в гетерологической дрожжевой экспрессионной системе, для которой активность 4CL не описана в литературе. Для этого были выбраны несколько генов 4CL из *Panicum virgatum* (Pv4CL1), *Arabidopsis thaliana* (At4CL1, At4CL2) и *Nicotiana tabacum* (Nt4CL), которые на основе анализа литературы были способны взаимодействовать с кофейной кислотой (приложение табл. 2).

Данная работа была проведена совместно с Надеждой Мышкиной, Кареном Саркисяном (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН), Луизой Гонзалес Сомермейер (Институт Науки и Технологии, Австрия).

**Таблица 1.** Соответствие сокращенных названий ПКС и организма, из генома которого был выбран ген.

Организм, из генома которого выбран ген	Сокращение ПКС	Ссылка на исследование
<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)



**Рисунок 21.** Схема реакции биolumинесценции грибов: трансформация кофейной кислоты в гиспидин, люциферин и оксильюциферин с испусканием света. H3H – гиспидин-3-гидроксилаза, Luz – люцифераза, HispS – гиспидинсинтаза, NpgA – фосфопантетеин-трансфераза из *A. nidulans*, PKS – поликетидсинтаза III типа из растений, 4CL – 4-кумароил-КоА-лигаза. Адаптировано из (Palkina и др., 2024).

### 3.6. Анализ функционирования отобранных ферментов и их сравнение в клетках дрожжей

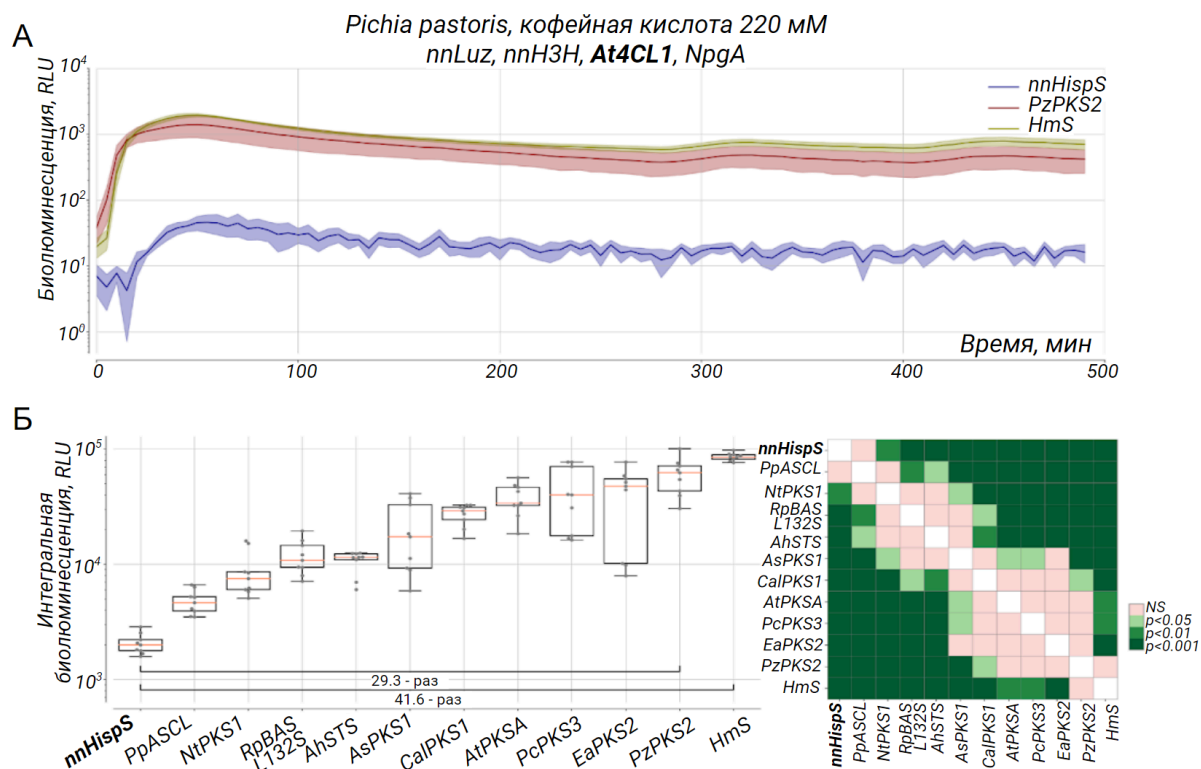
#### 3.6.1 Анализ и сравнение ПКС III типа из растений

Первоначально проверку отобранных ПКС проводили в клетках дрожжей *Pichia pastoris*. Функционирование ферментов проверяли на стабильных линиях, в которых также экспрессировали гены ферментов биolumинесцентной системы *N. nambi*: люциферазы (nnLuz) и гиспидин-3-гидроксилазы (nnH3H). Для образования КоА-тиозфиров – субстратов ПКС растений, стабильные линии экспрессировали ген из *Arabidopsis thaliana* (At4CL1). В качестве контроля использовали линию (см. Результаты, раздел 3.2), экспрессирующую ген гиспидинсинтазы *N. nambi* (nnHisps) совместно со вспомогательным ферментом, необходимым для его работы: фосфопантетеин-трансферазой (NpgA). Сравнение ПКС проводили, анализируя уровень биolumинесцентного сигнала дрожжей при добавлении кофейной кислоты, которая, как предполагается, последовательно превращается в гиспидин, затем в люциферин грибов и оксилуциферин (рис.21).

Согласно полученным результатам, 11, то есть половина выбранных ферментов среди ПКС III типа растений, показали свою функциональность в клетках дрожжей при добавлении кофейной кислоты и демонстрировали биolumинесцентный сигнал выше контрольной линии с гиспидинсинтазой *N.nambi* (рис.22). Среди ферментов, приводящих к биolumинесценции колоний дрожжей, был в том числе ПКС из хвоща, ген которого был предсказан из анализа транскриптома. Любопытно, что ферменты PmSPS1 и PmSPS2, для которых было описано производство гиспидина, не приводили к свечению дрожжей при добавлении кофейной кислоты. Это может свидетельствовать о том, что гиспидин производится на очень низком уровне и/или является не основным продуктом этих ПКС, что согласуется с данными, описанными в работе (Pluskal и др., 2019). В ходе сравнения наиболее яркими были системы с PzPKS2 и HmS – ферменты из свинчатки цейлонской (*Plumbago zeylanica*) и гортензии крупнолистной (*Hydrangea macrophylla*) (рис.22). Таким образом, удалось создать гибридную биolumинесцентную систему, состоящую из ферментов растений ПКС и 4CL, а также ферментов из гриба *N.nambi* nnLuz, nnH3H.

Данная работа была проведена совместно с Надеждой Мышкиной, Аленой Малышевской (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН) и Юлианой

Мокрушиной (Лаборатория биоинформационных методов комбинаторной химии и биологии, ИБХ РАН).



**Рисунок 22.** Биолуминесцентный сигнал дрожжей *P. pastoris* при добавлении 220 мМ кофейной кислоты. Линии дрожжей экспрессировали гены ферментов nnLuz, nnH3H, nnHispS с NpgA или гены поликетидсинтаз III типа из растений, а также At4CL1 (А, Б).

### 3.6.2 Анализ и сравнение 4-кумароил-КоА-лигаз

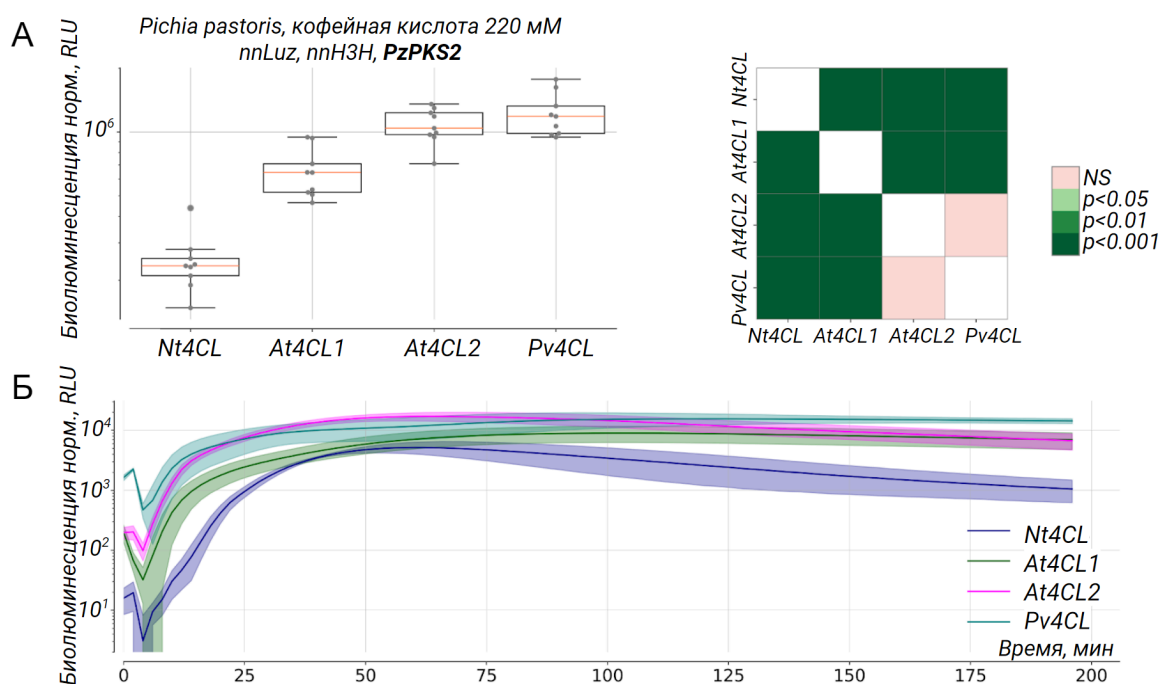
Для оптимизации биосинтеза гиспидина было решено подобрать наиболее эффективный 4CL в клетках дрожжей, для чего сравнили ферменты из *Panicum virgatum* (Pv4CL1), *Arabidopsis thaliana* (At4CL1, At4CL2) и *Nicotiana tabacum* (Nt4CL) (табл.2) в сочетании с одной из наиболее эффективных ПКС – PzPKS2. Сравнение проводили на стабильных линиях дрожжей *P. pastoris*, экспрессирующих гены ферментов биолуминесцентной системы *N. nambii* nnLuz и nnH3H, при регистрации свечения после добавления к колониям кофейной кислоты. Так в ходе работы Pv4CL1 был выбран как наиболее оптимальный фермент в паре с PzPKS2, который позволял увеличить сигнал относительно At4CL1 (рис.23).

Мы также проанализировали ПКС в клетках *P. pastoris*, совместно с Pv4CL1 при обработке разными концентрациями кофейной кислоты. Сочетание эффективного 4CL и ПКС растений позволило добиться увеличения биолуминесцентного сигнала

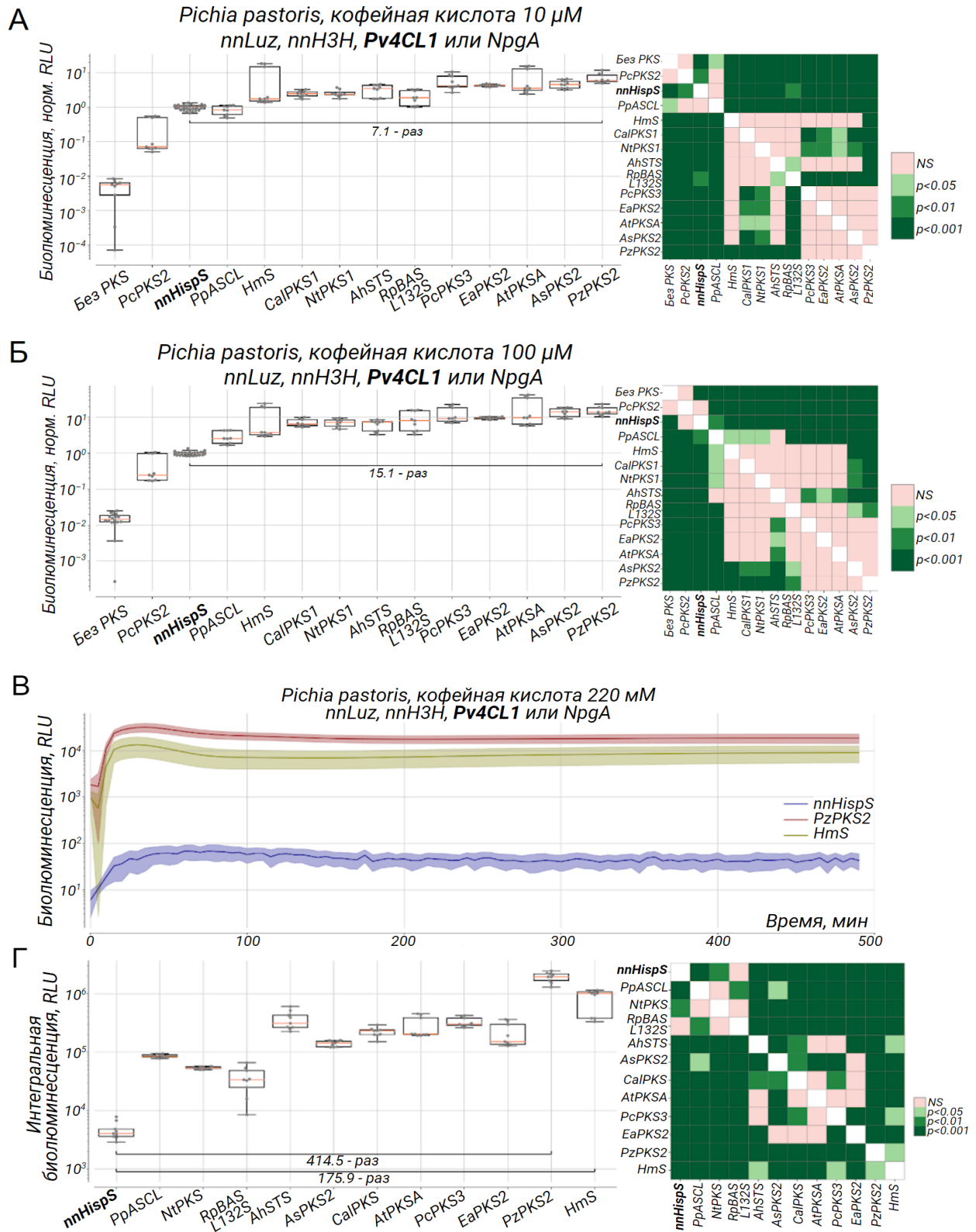
гибридного пути относительно системы с грибными ферментами nnHispS до 1-2 порядков (рис.24).

**Таблица 2.** Соответствие сокращенных названий 4CL и организма, из генома которого был выбран ген.

Организм, из генома которого выбран ген	Сокращение 4CL	Ссылка на исследование
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>At4CL1, At4CL2</i>	(Costa et al. 2005)
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Nt4CL2</i>	(Z. Li and Nair 2015)
<i>Panicum virgatum</i>	<i>Pv4CL1</i>	(B. Xu et al. 2011)



**Рисунок 23.** Биолуминесцентный сигнал дрожжей *P. pastoris*, экспрессирующих гены ферментов nnLuz, nnH3H, PzPKS2 и гены разных 4CL, при добавлении 220 мМ кофейной кислоты.



**Рисунок 24.** Биолюминесцентный сигнал дрожжей *P. pastoris*, экспрессирующих гены ферментов nnLuz, nnH3H, Pv4CL1 и гены поликетидсинтаз III типа из растений, при добавлении кофейной кислоты 10  $\mu\text{M}$  (А), 100  $\mu\text{M}$  (Б), 220 мМ (В, Г).

### 3.7 Подтверждение биосинтеза гиспицина растительными ПКС с помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа

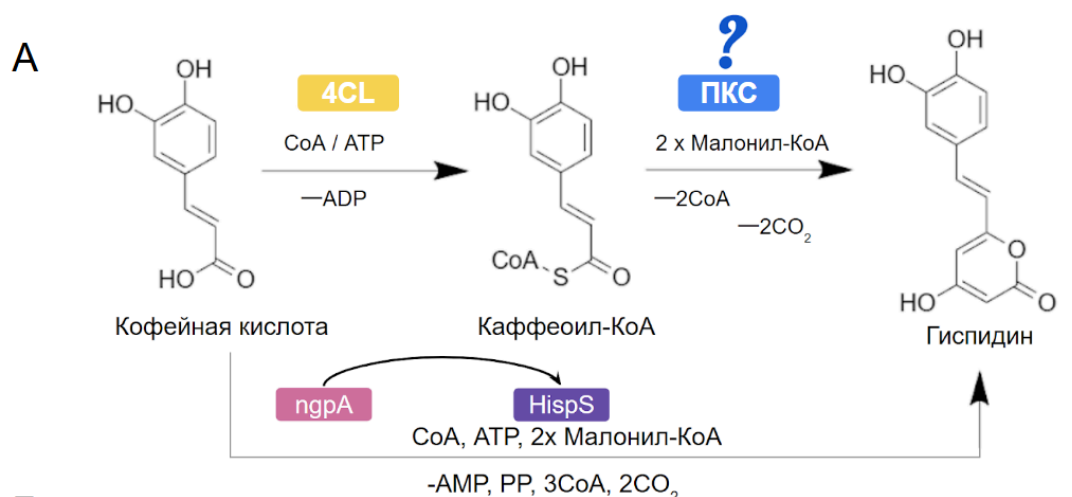
Как было описано выше (Раздел Результаты, Глава 3.4), биолюминесцентная система *N. nambi*, а именно H3H, Luz и nnHispS, обладают некоторой толерантностью к субстратам, с которыми они способны взаимодействовать и приводить к свечению. Согласно литературным данным, ПКС также могут синтезировать широкий спектр поликетидов с разными структурами. При этом ферменты, синтезирующие гиспидин, среди ПКС растений почти не описаны. Поэтому мы решили уточнить, действительно ли люминесценция дрожжей отражает уровень продукции гиспицина. Для этого мы изучили продукт ПКС и 4CL, образующийся из кофейной кислоты, с помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Чтобы обеспечить накопление продукта для последующей работы, были созданы стабильные линии дрожжей *P. pastoris*, экспрессирующие только гены At4CL1 и различные ПКС (рис.25 А). В работу взяли также PmSPS1 и PmSPS2 из перца, для которых описано производство гиспицина, однако к свечению дрожжевых колоний не приводящих .

В ходе работы нам удалось установить, что линии дрожжей, экспрессирующие гены ферментов 4CL и ПКС, аналогичные линиям, которые дополнительно содержали nnH3H и nnLuz и демонстрировали свечение при добавлении кофейной кислоты, действительно приводили к синтезу гиспицина в присутствии кофейной кислоты (рис.25 Б). Такая закономерность была характерна и для линии, содержащей гиспидинсинтазу *N. nambi* совместно с NpgA. Вместе с этим, для образцов, экспрессирующих гены ПКС из перца опьяняющего, гиспицина обнаружено не было. Этот результат согласуется с отсутствием свечения аналогичных линий *P. pastoris*, экспрессирующих гены nnLuz, nnH3H

Таким образом, данные ВЭЖХ-МС/МС анализа подтверждают, что люминесценция в созданной дрожжевой системе отражает производство гиспицина, как в случае грибной гиспидинсинтазы, так и для растительных поликетидсинтаз.

Данная работа была проведена совместно с Ольгой Белозеровой (Лаборатория антибиотикорезистентности, ИБХ РАН) и Сергеем Ковальчуком (Лаборатория биоинформационных методов комбинаторной химии и биологии, ИБХ РАН).



**Б**

Название образца	Наличие гиспидина в образце при добавлении кофейной кислоты	Свечение аналогичных колоний (+H3H, +Luz) при добавлении кофейной кислоты
<i>nnHispS + npgA</i>	+	+
<i>AsPKS2 + At4CL1</i>	+	+
<i>HmS + At4CL1</i>	+	+
<i>AtPKSA + At4CL1</i>	+	+
<i>PpASCL + At4CL1</i>	+	+
<i>PcPKS3 + At4CL1</i>	+	+
<i>RpBAS_L132S + At4CL1</i>	+	+
<i>EaPKS2 + At4CL1</i>	+	+
<i>PmSPS1 + At4CL1</i>	-	-
<i>PmSPS2 + At4CL1</i>	-	-
<i>PzPKS2 + At4CL1</i>	+	+

**Рисунок 25.** А) Схема биосинтеза гиспидина из кофейной кислоты в линиях дрожжей для ВЭЖХ-МС/МС анализа с помощью гиспидинсинтазы грибов (HispS) и 4-фосфопантетеинилтрансферазы (NpgA), а также с помощью ферментов из растений 4-кумароил-КоА-лигазы (4CL) и поликетидсинтазы III типа (PKS). Б) Результаты ВЭЖХ-МС/МС анализа линий дрожжей, экспрессирующих гены ПКС, At4CL1 и nnHispS, NpgA. «+» – гиспидин был обнаружен в образце (либо свечение аналогичных колоний при добавлении кофейной кислоты детектировано), «-» – гиспидин не был обнаружен в образце (либо свечение аналогичных колоний при добавлении кофейной кислоты не детектировано).

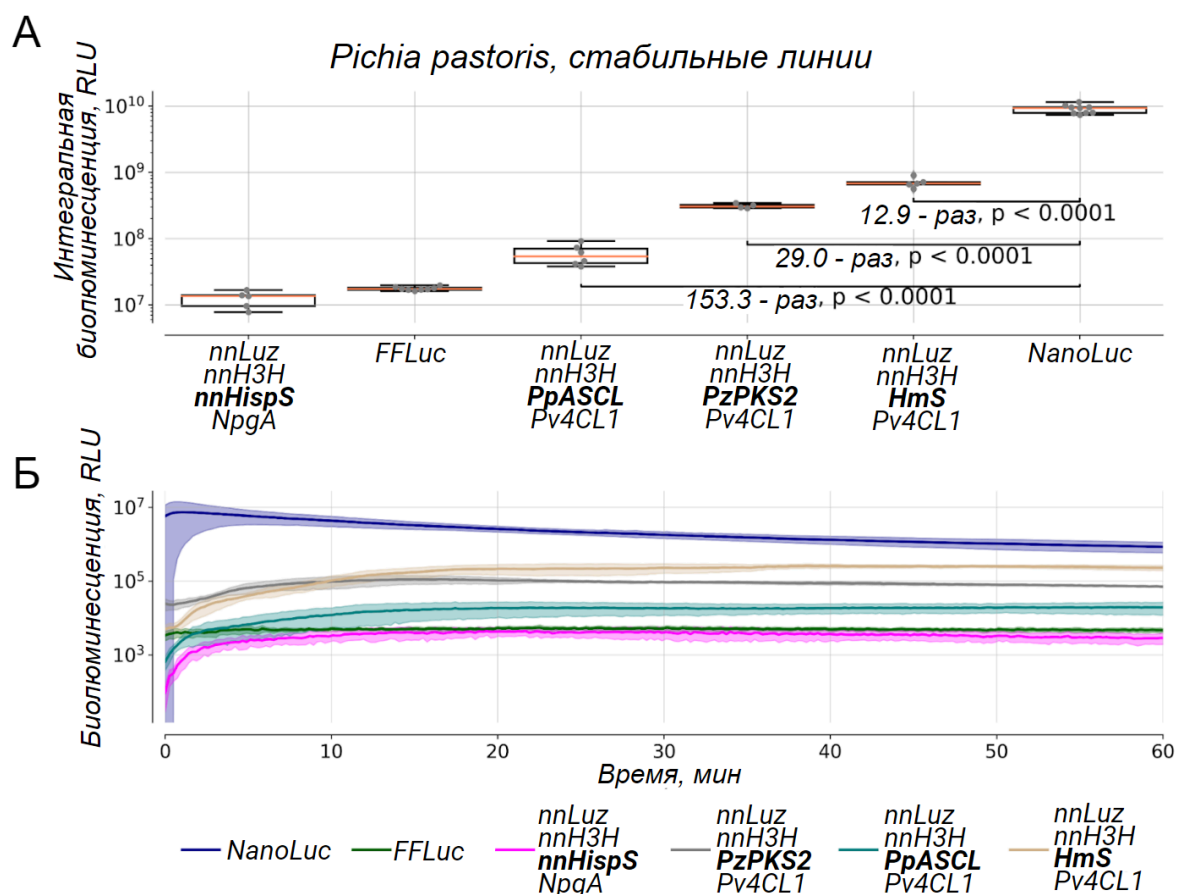
### 3.8 Сравнение гибридной биолюминесцентной системы с описанными ранее люциферин-люциферазными реакциями в клетках дрожжей

На сегодняшний день открыто несколько десятков биолюминесцентных систем. Создав новую гибридную биолюминесцентную систему на базе ферментов *N. nambi* nnLuz и nnH3H, а также ферментов из растений ПКС III типа и Pv4CL1, мы



решили сравнить уровень ее свечения с широко используемыми на практике люциферин-люциферазными реакциями в клетках дрожжей. Мы выбрали HmS, PzPKS2 и PrASCL, совместно с Pv4CL1, nnLuz, nnH3H, которые показали высокий и средний уровень биолуминесценции в прошлых экспериментах. Для сравнения мы взяли биолуминесцентную систему грибов nnHispS, NpgA, nnLuz, nnH3H, а также часто применяемые в работах люциферазу светлячка *Photinus pyralis*, производящую свечение при взаимодействии с субстратом D-люциферин (Green и McElroy, 1956; Thorne и др., 2010), и искусственно оптимизированную люциферазу глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris* под коммерческим названием NanoLuc (далее – нанолук), для которой разработаны наборы для прижизненного мониторинга люминесценции клеток (Hall и др., 2012; *Nano-Glo® Live Cell Assay System*, n.d.). Анализ стабильных линий *P. pastoris* проводили при добавлении субстрата в 100 мМ концентрации: кофейная кислота для биолуминесцентной системы грибов и гибридной системы, D-люциферин для FFLuz, а в случае NanoLuc – рекомендованный протокол фирмы Promega.

По результатам сравнения, все гибридные системы на основе ПКС растений показали уровень свечения выше, чем FFLuc. Линия, экспрессирующая HmS, демонстрировала сигнал примерно в 40 раз превышающий свечение FFLuc и в 12 раз слабее NanoLuc (рис.26). Таким образом, гибридная биолуминесцентная система, катализирующая три последовательные реакции начиная с кофейной кислоты, показала высокую эффективность в дрожжах, по сравнению с альтернативными репортерными биолуминесцентными системами, катализирующими одну реакцию с соответствующими люциферинами.



**Рисунок 26.** Сравнение стабильных линий дрожжей, экспрессирующих гены разных биолуминесцентных систем: гибридная система растительных ПКС и ферментов *N.nambi* (HmS, PzPKS2, или PpASCL с Pv4CL1, nnLuz и nnH3H), биолуминесцентная система *N.nambi* (nnHispS, NpgA, nnLuz и nnH3H), люцифераза светлячка (FFLuc) и нанолюк (NanoLuc). Субстрат добавляли в концентрации 100  $\mu$ M (Для нанолюк использовали концентрацию субстрата, рекомендованную производителем). А) Интегральная биолуминесценция за 60 мин. Б) Изменение биолуминесценции во времени после добавления субстрата. Измерения проведены на микропланшетном ридере TECAN в режиме детекции люминесценции.

### 3.9 Анализ функционирования ферментов биосинтеза гиспидина в клетках млекопитающих *HEK293NT*

#### 3.9.1 Анализ функционирования ПКС из растений в клетках млекопитающих

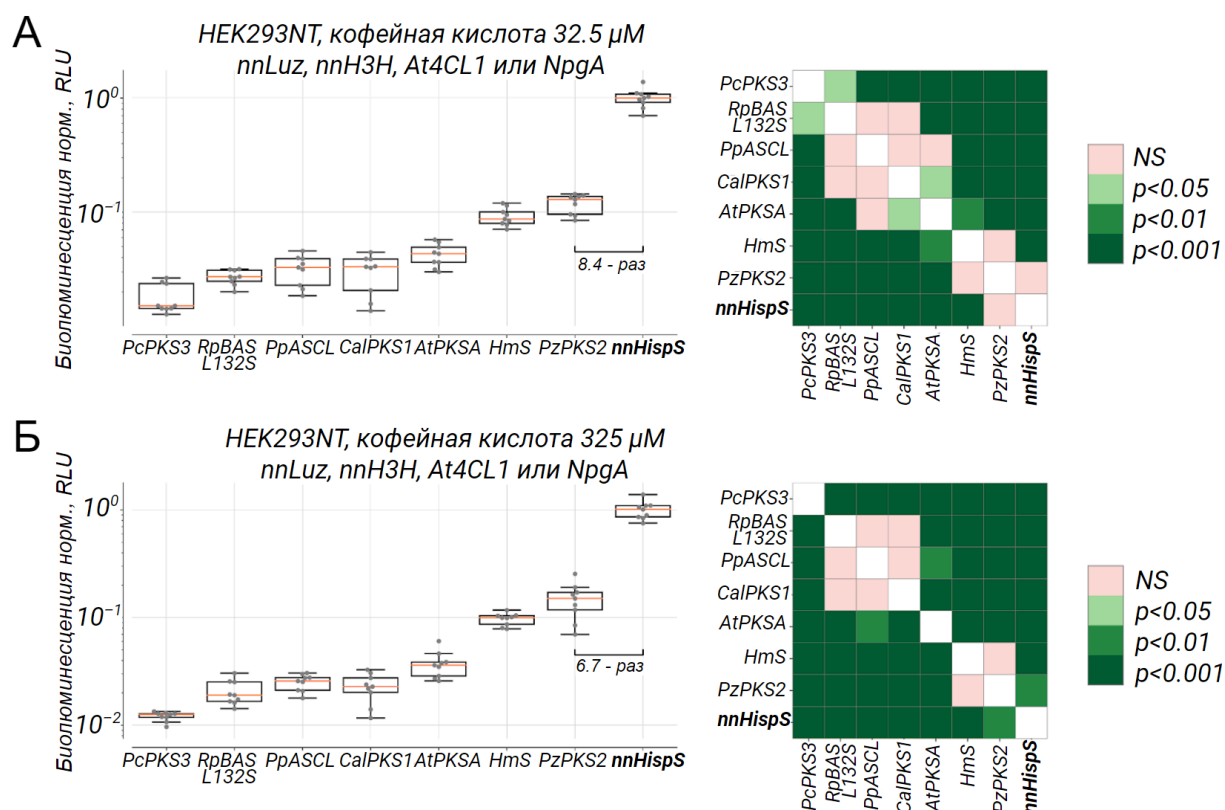
Оптимизация биолюминесцентной системы в клетках млекопитающих играет важную роль для будущих исследований в области медицины и фармакологии, поэтому проверку ПКС растений совместно с генами ферментов биолюминесцентной системы *N.nambi* проводили и в этой гетерологической системе. Для работы была выбрана модифицированная культура клеток почки эмбриона человека HEK293NT. С данной культурой ранее работали в нашей лаборатории при исследовании биолюминесцентной системы *N.nambi* и создании автономно светящихся клеток HEK293NT (Kotlobay и др., 2018; Mitouchkina и др., 2020).

Для анализа функционирования ПКС из растений в клетках HEK293NT мы взяли ферменты, которые уже показали свою работу в клетках дрожжей. Проверку ПКС проводили при котрансфекции клеток млекопитающих несколькими плазмидами для временной экспрессии генов ферментов биолюминесцентной системы *N.nambi* Luz, H3H и At4CL1. Свечение образцов с ПКС растений сравнивали с контролем, экспрессирующем гены гиспидинсинтазы грибов nnHisps и NpgA. Сравнение интенсивности люминесценции проводили при добавлении кофейной кислоты к клеткам.

В ходе работы было отмечено, что семь ПКС растений приводили к свечению клеток млекопитающих при добавлении кофейной кислоты. Любопытно, что некоторые ПКС (NtPKS, AhSTS, EaPKS2, AsPKS1, AsPKS2), которые приводили к свечению клеток дрожжей, не показали такой активности в клетках млекопитающих.

Ферменты, демонстрирующие наиболее яркий сигнал среди растительных ПКС, были такие же, как и в клетках *P. pastoris* – HmS, PzPKS2. При этом уровень сигнала, произведенный ими был ниже, чем в системе с гиспидинсинтазой *N. nambi*, в несколько раз (рис.27). Таким образом, мы показали функционирование гибридного биолюминесцентного пути в клетках млекопитающих, гиспидинсинтаза *N.nambi* в котором заменена на более компактный фермент – ПКС растений, что в будущем сделает доставку генов биолюминесцентной системы с помощью вирусных векторов, чувствительных к размеру, более удобной.

Данная работа была проведена совместно с Надеждой Мышкиной и Анной Алекберовой (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН).



**Рисунок 27.** Биоломинесцентный сигнал клеток млекопитающих HEK293NT при добавлении кофейной кислоты 32,5  $\mu$ M (А) и 325  $\mu$ M (Б). Клетки экспрессировали гены ферментов nnLuz, nnH3H, nnHispS с NpgA или новые гены поликетидсинтаз III типа из растений совместно с At4CL1.

### 3.9.2 Анализ функционирования 4-кумароил-КоА-лигаз в клетках млекопитающих

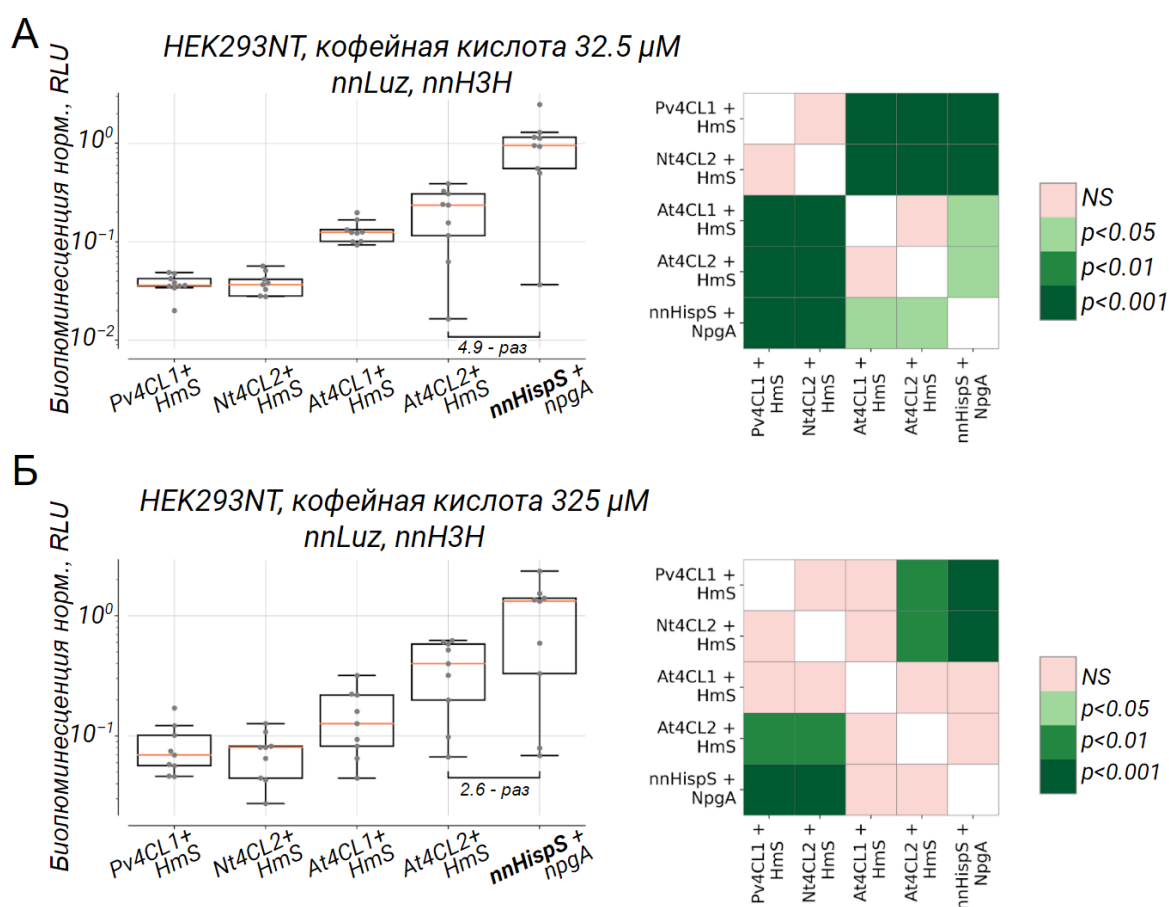
Для оптимизации биосинтеза гиспидина в клетках млекопитающих мы провели сравнение 4CL для одного из наиболее эффективных ферментов среди ПКС растений – HmS. Этот анализ также проводили на клетках HEK293NT при временной экспрессии генов ферментов 4CL, HmS, Luz и H3H и регистрации биоломинесценции при добавлении кофейной кислоты.

Оказалось, что этап биосинтеза кафеоил-КоА из кофейной кислоты в клетках млекопитающих важен для оптимизации биосинтеза гиспидина. Так 4CL из *Panicum virgatum* (Pv4CL1), *Arabidopsis thaliana* (At4CL1, At4CL2) и *Nicotiana tabacum* (Nt4CL) при временной экспрессии в клетках HEK293NT показали разную эффективность в сочетании с HmS (рис.28). Таким образом, нам удалось подобрать более эффективный 4CL – At4CL2, и добиться повышения уровня сигнала примерно в 2 раза относительно прошлого сравнения с At4CL1. Однако сигнал образцов с наиболее эффективным

сочетанием HmS и At4CL2 был ниже, чем клеток, экспрессирующих ген гиспидинсинтазы *N. nambi*.

Анализируя работу гибридной биолюминесцентной системы в гетерологических хозяевах, мы предполагаем, что отличие работы ПКС в разных организмах может быть связано с особенностями дрожжей и млекопитающих: размером клеток, скоростью их деления и скоростью поглощения кислорода (J. Xu и др., 2011; J. Xu и Zhang, 2014).

Данная работа была проведена совместно с Надеждой Мышкиной и Анной Алекберовой (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН).



**Рисунок 28.** Биолюминесцентный сигнал клеток млекопитающих HEK293NT при добавлении кофейной кислоты 32.5  $\mu$ M (А) и 325  $\mu$ M (Б). Клетки экспрессировали гены ферментов nnLuz, nnH3H, HmS и разные гены 4CL.

### 3.10 Анализ функционирования ферментов биосинтеза гиспидина в клетках растений

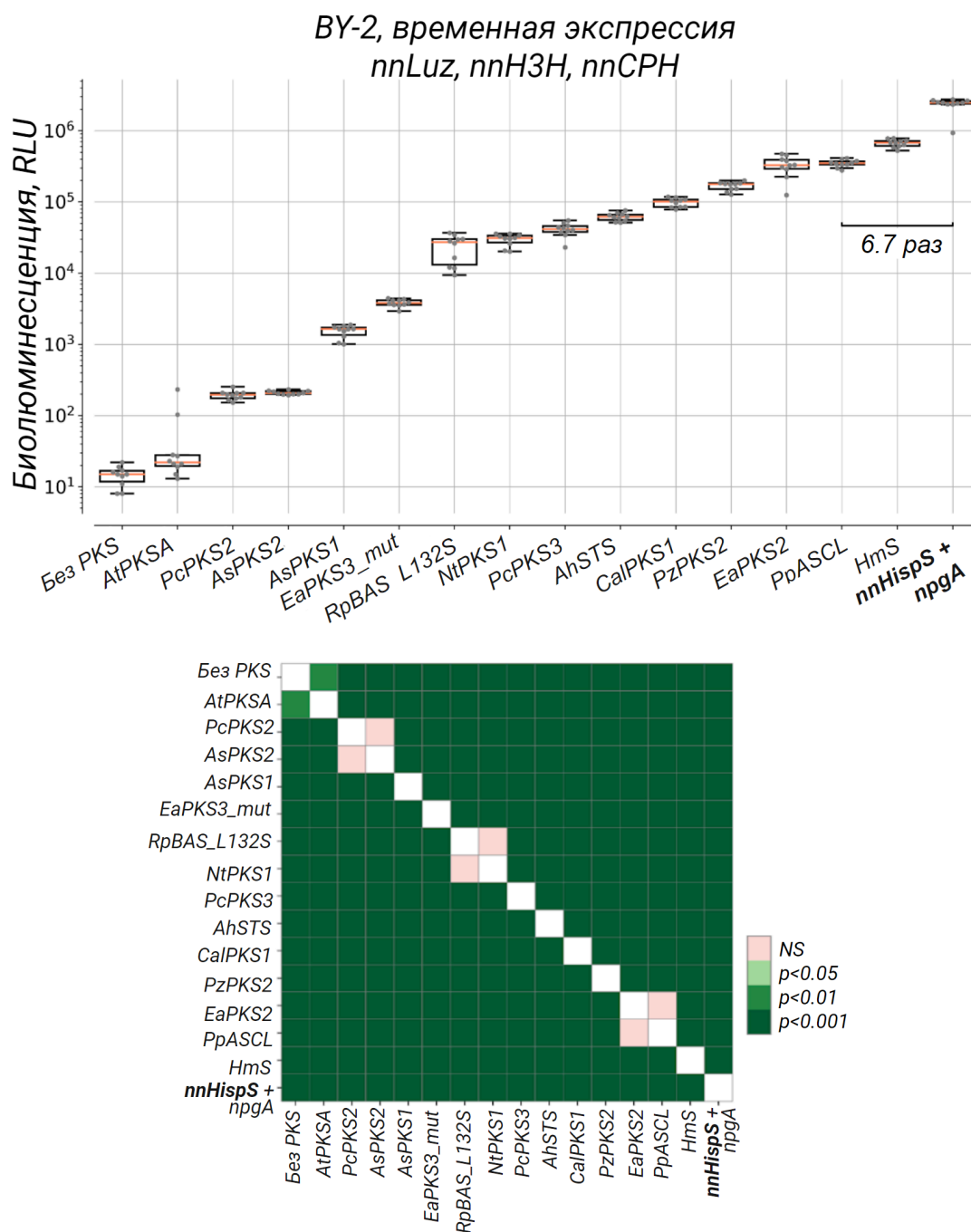
#### 3.10.1 Временная экспрессия ПКС в клетках ВУ-2

В растениях субстрат, необходимый для биолюминесценции – кофейная кислота, присутствует эндогенно, как метаболит фенилпропаноидного пути. Так, при экспрессии ферментов биолюминесцентного каскада *N. nambi* было возможно создание автономно светящихся растений (Mitiochukina и др., 2020). Оптимизация биосинтеза гиспидина из кофейной кислоты и усовершенствование биолюминесцентной системы *N. nambi* важно для дальнейшего развития люминесцентного биоимиджинга растений. Вместе с тем, традиционные методы тестирования функциональности белков в растениях, такие как временная экспрессия в листьях целого растения с помощью агробактерий, низкопроизводительны и трудоемки.

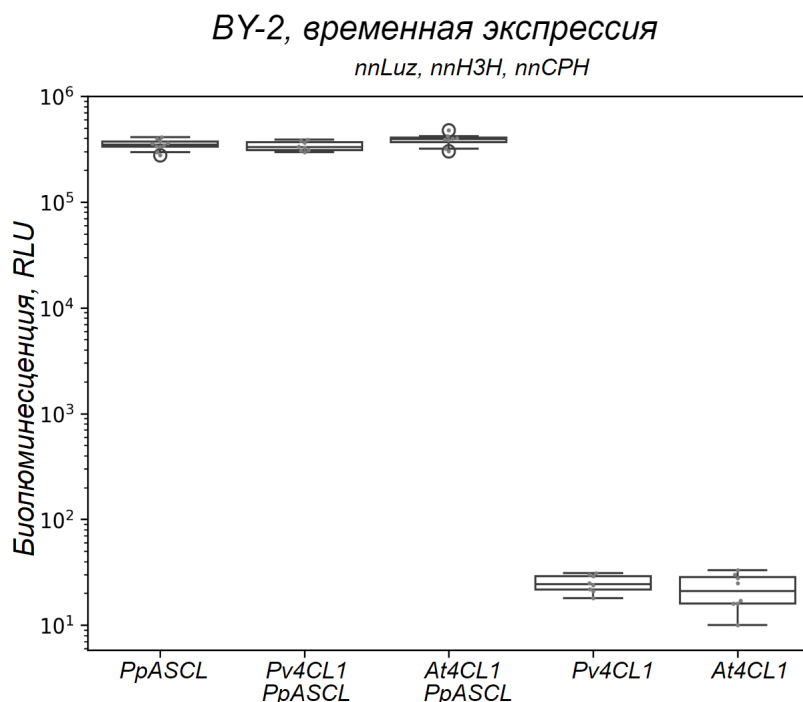
Недавно была описана система высокопроизводительного скрининга для клеток растений на базе суспензионной культуры клеток табака Bright Yellow-2 (BY-2) (Brandizzi и др., 2003; Gengenbach и др., 2020), которая позволяет быстро и удобно анализировать рекомбинантные белки и тестировать интересующие конструкции. Трансгены для временной экспрессии можно доставлять в агрегаты клеток ВУ-2 с помощью агробактерий, аналогично экспериментам в листьях целых растений, но в высокопроизводительном формате микропланшетов. Для нашей цели – проверки активности ПКС растений и сравнения их между собой, в присутствии ферментов биолюминесцентной системы *N. nambi* – такая система стала удобным инструментом.

Для тестирования в клетках ВУ-2 мы выбрали ПКС, которые ранее показали свою функциональность в клетках дрожжей. При временной коэкспрессии отобранных генов ПКС совместно с nnLuz, nnH3H и nnCPH нам удалось зарегистрировать биолюминесценцию сравнимую с люминесценцией гиспидинсинтазы *N. nambi* (рис.29). При этом экспрессия дополнительного гена 4CL не была необходима в клетках ВУ-2 и не приводила к росту уровня свечения соответствующих образцов (рис.30). Это свидетельствует о наличии эндогенной активности 4CL в растительных клетках, что еще больше сокращает необходимый размер доставляемой генетической конструкции. В зависимости от конкретной ПКС, уровень сигнала гибридной биолюминесцентной системы изменялся на 4 порядка величины, приближаясь к яркости nnHisps из *N. nambi*. Наибольший уровень свечения

показали HmS, PpASCL, EaPKS2, PzPKS2. Таким образом, при временной экспрессии на модели агрегатов культуры клеток табака BY-2 показана функциональность гибридной биолуминесцентной системы в растительных клетках.



**Рисунок 29.** Автономная биолуминесценция клеток BY-2, временно экспрессирующих гены ферментов nnLuz, nnH3H, CPH и разные ПКС растений, а также nnHispS и NpgA.



**Рисунок 30.** Биолуминесцентный сигнал клеток BY-2, экспрессирующих гены ферментов nnLuz, nnH3H, CPH с добавлением At4CL1, или Pv4CL1, или PpASCL в присутствии и отсутствии At4CL1 и Pv4CL1 без добавления субстрата.

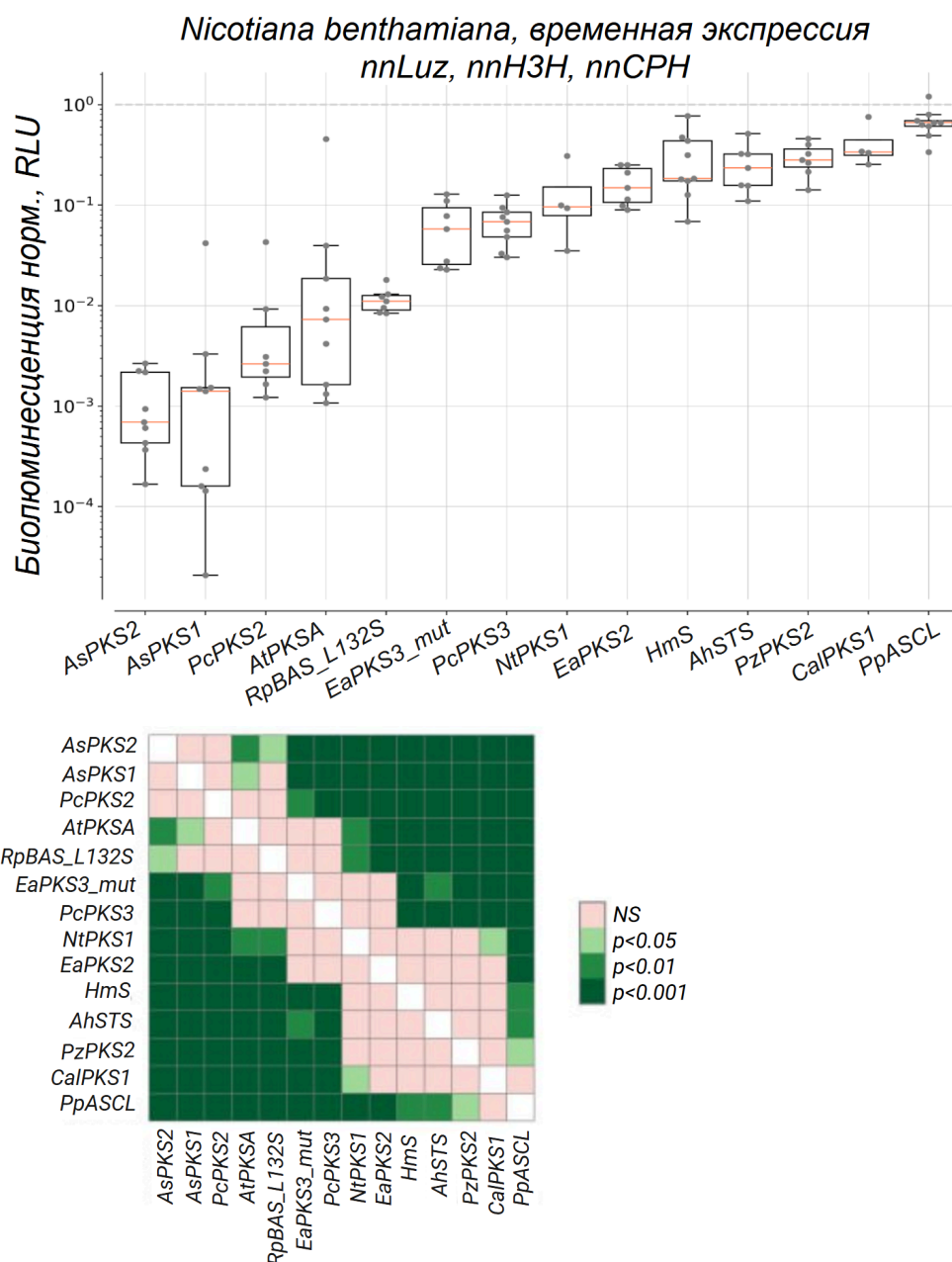
### 3.10.2 Временная экспрессия ПКС в листьях *Nicotiana benthamiana*

Инfiltrация растительных тканей агробактериями (далее – агроинfiltrация) представляет традиционный метод доставки трансгенов в растительные клетки для анализа временной экспрессии генов интересующих ферментов и их сочетаний. Часто для инъекций смесью агробактерий используют листья *Nicotiana benthamiana* как модельного объекта (Kapila и др., 1997). В отличие от культуры клеток BY-2, лишенных хлорофилла и находящихся в искусственной питательной среде, данный метод позволяет дополнительно проверить функциональность генов в контексте целого растения.

Анализируя результаты агроинfiltrации в листья *N. benthamiana*, мы отметили, что 14 из рассмотренных ферментов приводили к биолуминесценции при коэкспрессии с генами ферментов биолуминесцентной системы *N. nambi* Luz, H3H, CPH (рис.31). В данной гетерологической системе так же, как и в клетках BY-2, не было необходимости в экспрессии дополнительного гена 4CL из-за, предположительно, эндогенной активности этого фермента. Сравнение эффективности ПКС растений в листьях *N. benthamiana* показало высокий уровень сигнала для ферментов PzPKS2, HmS, EaPKS2, AhSTS и PpASCL, не отличимый от



nnHispS и NpgA. Таким образом, при агроинфильтрации листьев *N. benthamiana* автономная биолюминесценция гибридной системы достигла уровня системы с ферментами гриба *N. nambi*. Данный результат показывает, что использование растительных поликетидсинтаз позволяет не только сократить размер генно-инженерной конструкции, общее число необходимых ферментов, но и достигнуть сопоставимой яркости биолюминесценции.



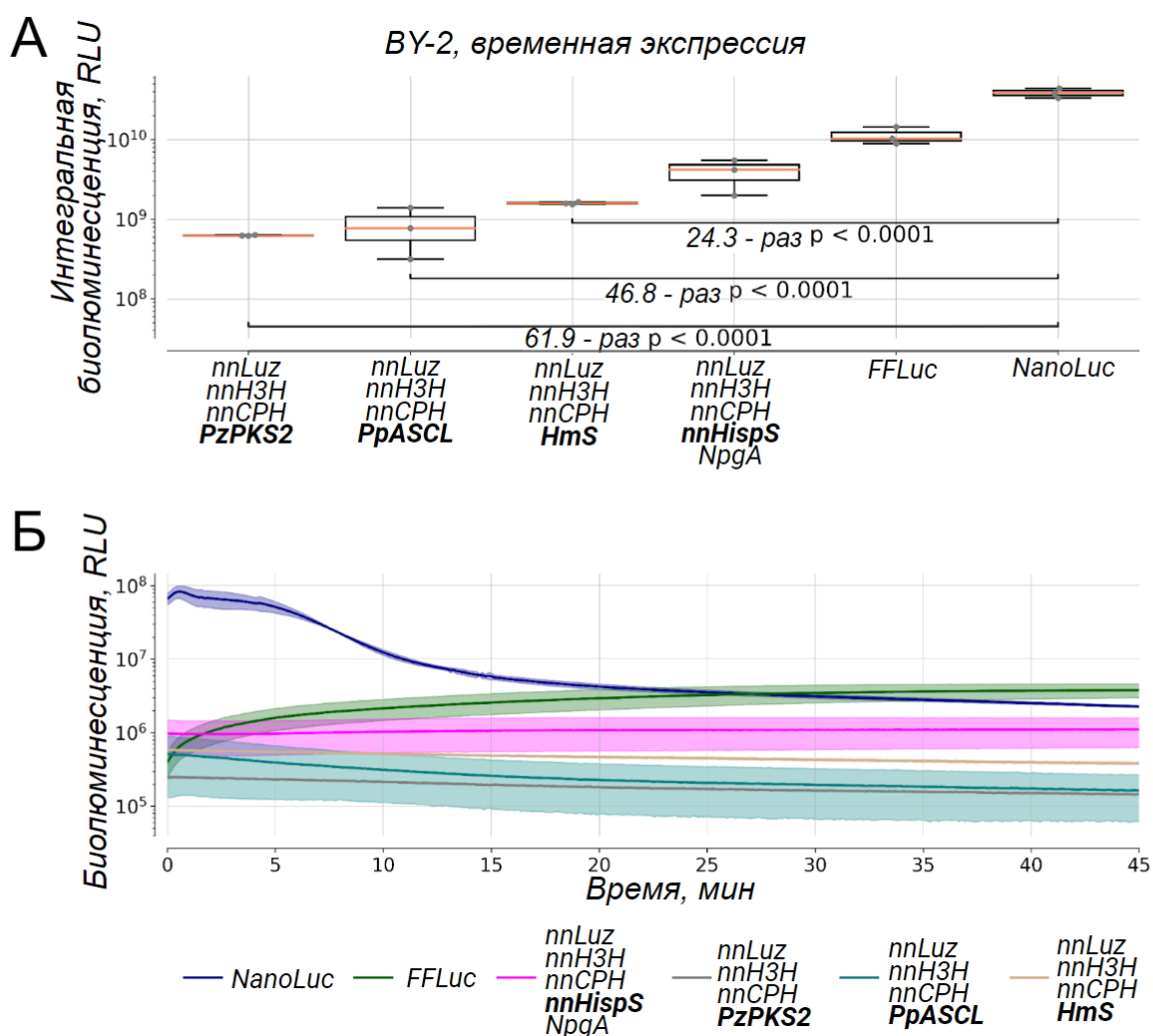
**Рисунок 31.** Биолюминесцентный сигнал агроинфильтраций листьев *Nicotiana benthamiana*, экспрессирующих гены ферментов nnLuz, nnH3H, CPH и разных ПКС растений, нормированный на сигнал агроинфильтраций листьев *Nicotiana benthamiana*, экспрессирующих гены ферментов nnLuz, nnH3H, CPH, nnHispS и NpgA, без добавления субстрата.

### 3.10.3 Сравнение гибридной биолюминесцентной системы с описанными ранее люциферин-люциферазными реакциями в клетках BY-2

Биолюминесценция, как инструмент растительной биологии, позволяет исследовать экспрессию генов, белок-белковые взаимодействия и многие другие процессы. Репортер люциферазы светлячка *Photinus pyralis* – FFLuc – часто используется в подобных исследованиях, но нестабильность субстрата усложняет процесс работы с ним при длительных экспериментах. Субстрат люциферазы NanoLuc более стабилен *in vivo* (Hall и др., 2012; Urquiza-García и Millar, 2019). Однако все эти репортерные системы требуют добавления субстрата для регистрации люминесценции в отличие от автономной биолюминесцентной системы *N. nambi*, которая способна показывать свечение от кофейной кислоты – эндогенного субстрата растений.

Опираясь на результаты, полученные ранее, мы решили сравнить созданные гибридные автономные биолюминесцентные системы с наиболее эффективными ПКС растений и ферментами *N. nambi* Luz, H3H, CPN, с другими биолюминесцентными системами в клетках табака BY-2. Для сравнения мы выбрали FFLuc и NanoLuc, которые анализировали ранее в системе клеток дрожжей. Сравнение проводили при временной экспрессии генов репортерных систем, в случае люцифераз FFLuc и NanoLuc добавляли соответствующие субстраты, а к клеткам, экспрессирующим автономные биолюминесцентные системы ничего не добавляли.

В клетках растений автономная биолюминесценция с участием растительной поликетидсинтазы HmS была в 24 раза тусклее, чем NanoLuc и в 7 раз слабее FFLuc (рис.32). Кинетика кривых люминесценции отличалась и достигала в максимальных значениях различий около 2-х порядков. Таким образом, яркость автономной гибридной биолюминесцентной системы оказалась ниже, чем у биолюминесцентных систем требующих добавления субстрата, но достаточной для проведения измерений на лабораторном планшетном люминометре. Такая биолюминесцентная система может стать инструментом для исследований на модели клеточных культур.



**Рисунок 32.** Сравнение при временной экспрессии в клетках BY-2 разных биолуминесцентных систем: гибридной системы с растительными ПКС и ферментами *N. nambi* (HmS, PzPKS2, или PpASCL, nnLuz, nnH3H, nnCPH), биолуминесцентной системы *N. nambi* (nnHispS, NpgA, nnLuz, nnH3H, nnCPH), люциферазы светлячка (FFLuc) и люциферазы NanoLuc. Субстрат для FFLuc добавляли в концентрации 100  $\mu$ M. Для NanoLuc использовали концентрацию субстрата, рекомендованную производителем. Измерения проведены на микропланшетном ридере TECAN в режиме детекции люминесценции.

### 3.10.4 ВЭЖХ-МС/МС анализ образцов растений, подтверждение наличия гиспидина при временной экспрессии

Для того, чтобы установить продукты и предположить субстраты, с которыми взаимодействует ПКС, мы провели ВЭЖХ-МС/МС анализ образцов растений, экспрессирующих некоторые ферменты биолуминесцентной системы. Среди ожидаемых субстратов мы сфокусировались на кофейной и кумаровой кислотах. Среди продуктов ПКС мы ожидали обнаружить, прежде всего, гиспидин и ряд аналогов, предсказанных теоретически.

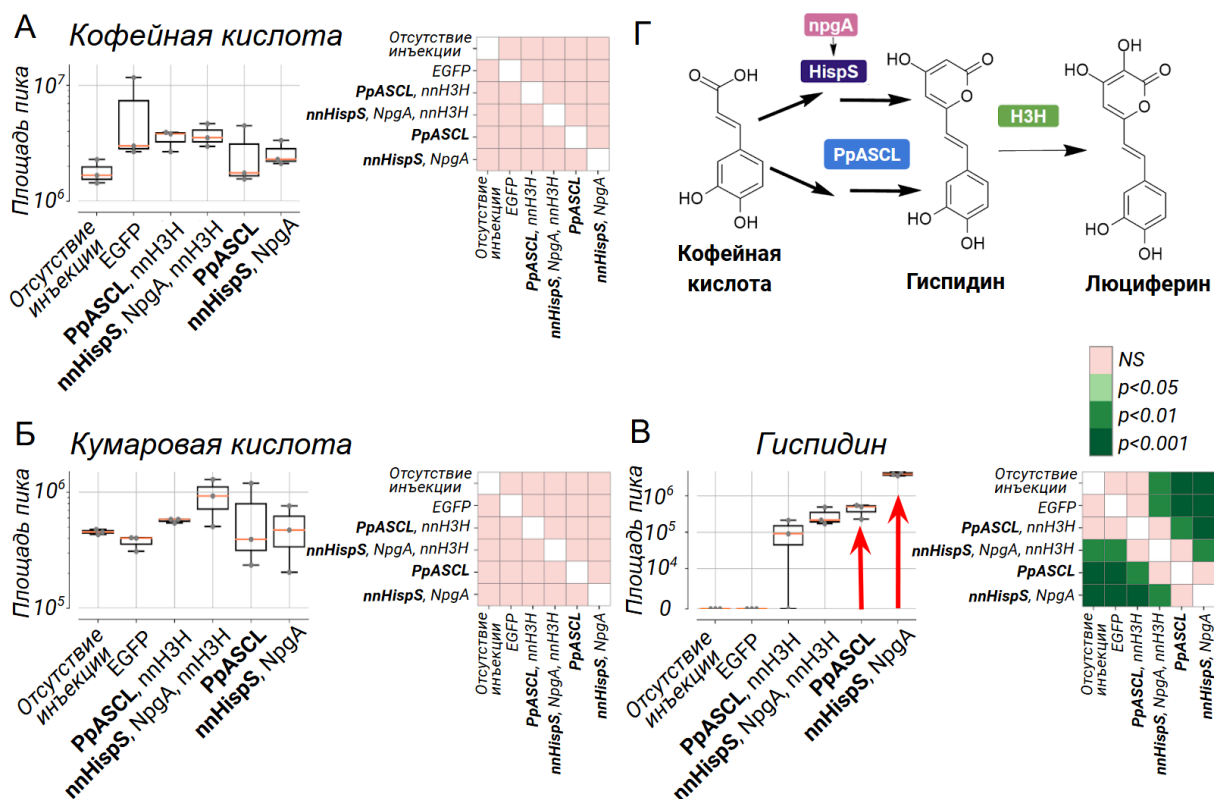
Листья *N. benthamiana* инфильтровали смесью агробактерий для временной экспрессии ПКС на высоком уровне (PrASCL, или смесь nnHisS с NpgA). В данном эксперименте мы ожидали, что основные продукты поликетидсинтаз будут накапливаться в растительных клетках, что облегчит их обнаружение методом ВЭЖХ-МС/МС. Также были подготовлены образцы, дополнительно экспрессирующие следующий фермент биолуминесцентной системы (НЗН), который, как ожидалось, должен трансформировать большую часть образующегося гиспидина в люциферин. В качестве образцов сравнения использовали временную экспрессию EGFP, чтобы исключить неспецифические изменения в метаболизме растений в ответ на агробактериальное заражение, а также листья без обработки агробактериями.

Согласно полученным данным, мы достоверно детектировали кофейную и кумаровую кислоту и их уровень не отличался от остальных образцов (рис.33 АБ). Это может свидетельствовать о том, что концентрация гидроксикоричных кислот поддерживается на определенном уровне и расход этих метаболитов восполняется за счет внутренних запасов клеток, несмотря на гиперэкспрессию тестируемых гиспидинсинтаз.

Кроме того, во всех образцах растений, экспрессирующих гены PrASCL и nnHisS с NpgA, в присутствии и отсутствии НЗН был обнаружен гиспидин (рис.33 В). Отличие в уровне сигнала этих образцов от контроля было значительное и превышало несколько порядков. Это подтверждает полученные ранее результаты на дрожжах, в которых мы также показали способность этих ферментов производить гиспидин из кофейной кислоты и что также соотносится с уровнем свечения. Уровень гиспидина в образцах с НЗН был ниже, что, вероятно, свидетельствует о его расходовании и трансформации в люциферин грибов, который, однако, было сложно детектировать в образцах из-за нестабильности молекулы.

Анализируя полученные данные, мы контролировали наличие в образцах и других продуктов ПКС, которые могли бы образовываться из кофейной или кумаровой кислот в ходе 1-3 стадий конденсации малонил-КоА и с помощью нескольких вариантов циклизации, исходя их данных описанных для других продуктов ПКС растений. Однако другие вероятные аналоги гиспидина, в том числе и биснорьянгонин (см. также рис.8), обнаружить в достаточных для идентификации количествах не удалось.

Данная работа была проведена совместно с Ольгой Белозеровой (Лаборатория антибиотикорезистентности, ИБХ РАН) и Сергеем Ковальчуком (Лаборатория биоинформационных методов комбинаторной химии и биологии, ИБХ РАН).



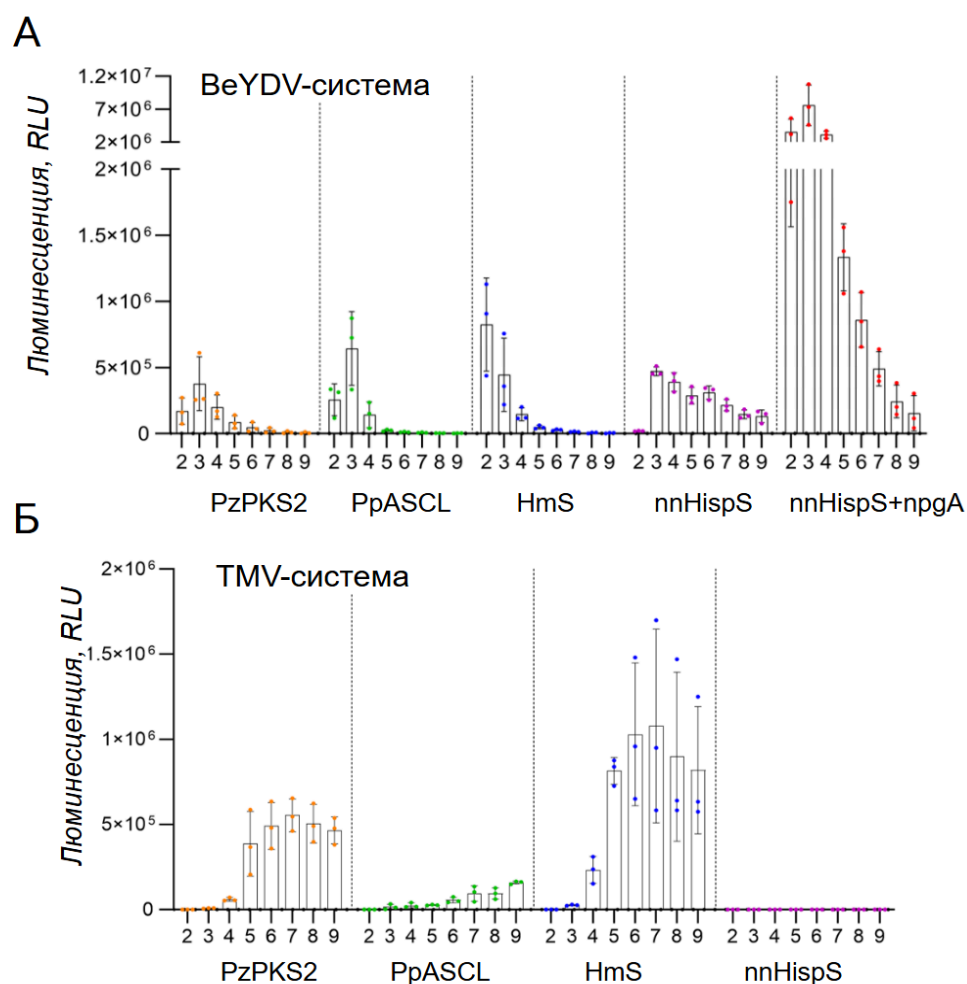
**Рисунок 33.** Данные ВЭЖХ-МС/МС для листьев *N. benthamiana*, отражающие содержание кофейной кислоты (А), кумаровой кислоты (Б) и гиспидина (В). (Г) Схема анализируемой реакции при ВЭЖХ-МС/МС анализе. Образцы растений экспрессировали гены PpASCL, или PpASCL с nnH3H, или nnHisS с NpgA, или nnHisS с NpgA и nnH3H, а также контрольные образцы, экспрессирующие EGFP, и листья без агроинфекции.

### 3.10.5 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 nnHisS 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 биолуминесцентный каскад грибов и гибридный биолуминесцентный путь демонстрировали сигналы биолуминесценции (рис.34). 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 биолуминесценцию при доставке TMV-системой. Этот результат показывает преимущество гибридного биолуминесцентного пути для практических приложений, которые чувствительны к размеру доставляемой конструкции.



**Рисунок 34.** 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  $\pm$  NpaA совместно с nnHispS).

### 3.10.6 Создание стабильных линий, экспрессирующих ген ПКС растений, и анализ их свечения

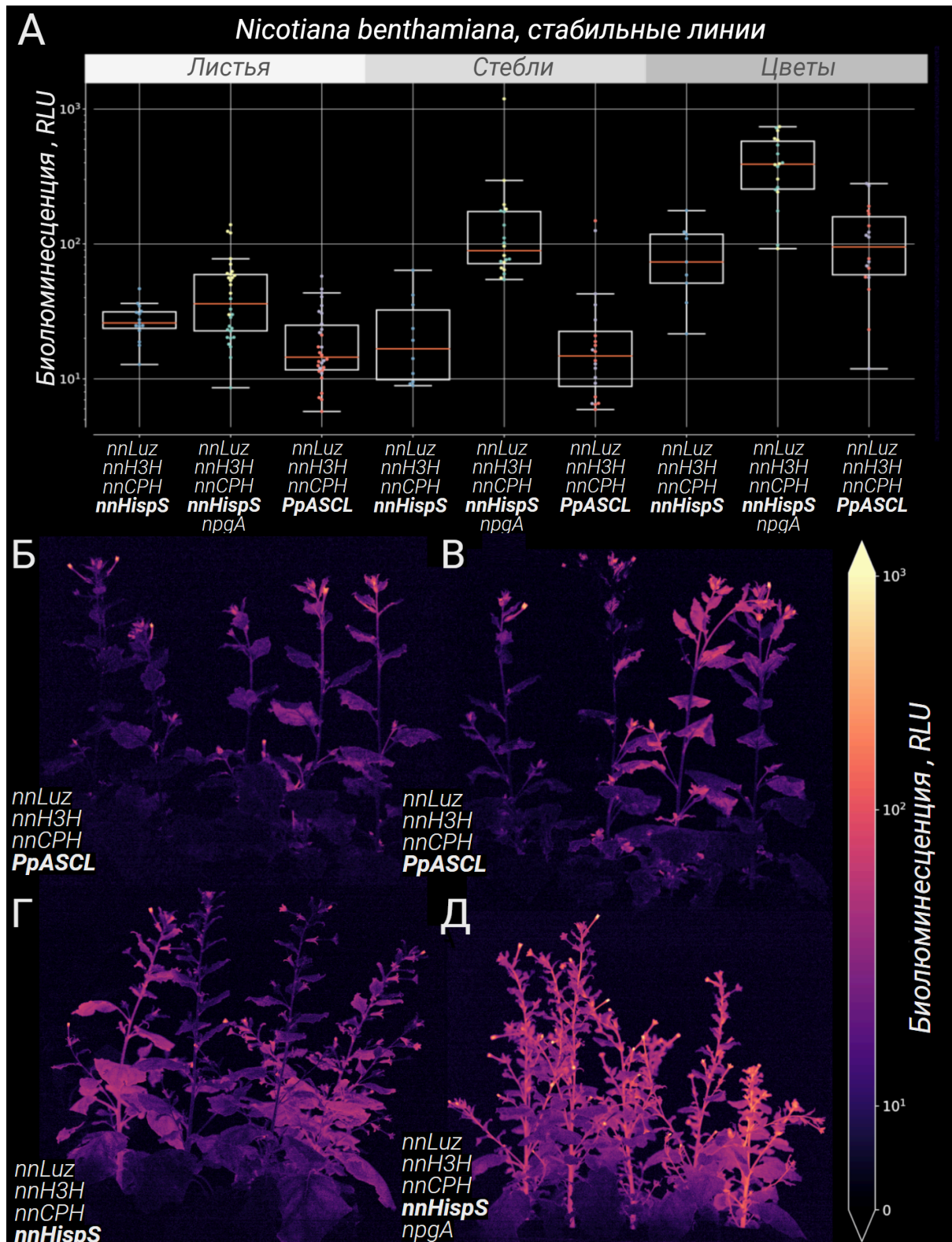
Характер функционирования ферментов при временной экспрессии генов и при создании стабильной линии растений могут отличаться. Как правило, уровень временной экспрессии выше (Q. Chen и Lai, 2015). Экспрессия генов в стабильных линиях зависит от места встройки, происходит не на таком высоком уровне как при агроинфильтрации, однако позволяет анализировать экспрессию генов на больших временных отрезках, включая наследование признаков следующими поколениями.

Таким образом, для анализа работы *in vivo* гибридной биолюминесцентной системы с ПКС растений и ферментами *N. nambi*, мы приступили к созданию стабильных линий *N. benthamiana*. Для создания стабильных линий выбрали одну из наиболее эффективных ПКС в экспериментах на растениях – PpASCL. Так, с помощью агробактериальной трансформации были получены растения, стабильно экспрессирующие гены PpASCL, nnH3H, nnLuz, nnCPH. Данную линию сравнили с линией *N. benthamiana*, стабильно экспрессирующей гены биолюминесцентной системы *N. nambi* nnLuz, nnH3H, nnCPH, nnHisS и NpgA.

Все полученные стабильные линии *N. benthamiana* демонстрировали устойчивое свечение. Яркость линий с PpASCL находилась на одном уровне с ранее опубликованной линией с nnHisS без NpgA (Mitouchkina и др., 2020), однако была слабее примерно на порядок в сравнении с уровнем сигнала от линии с nnHisS и NpgA. На стадии цветения наибольшая яркость наблюдалась для цветов для всех анализируемых линий (рис.35). Интересно, что на молодых растениях отличия в интенсивности люминесценции сильнее (рис.36).

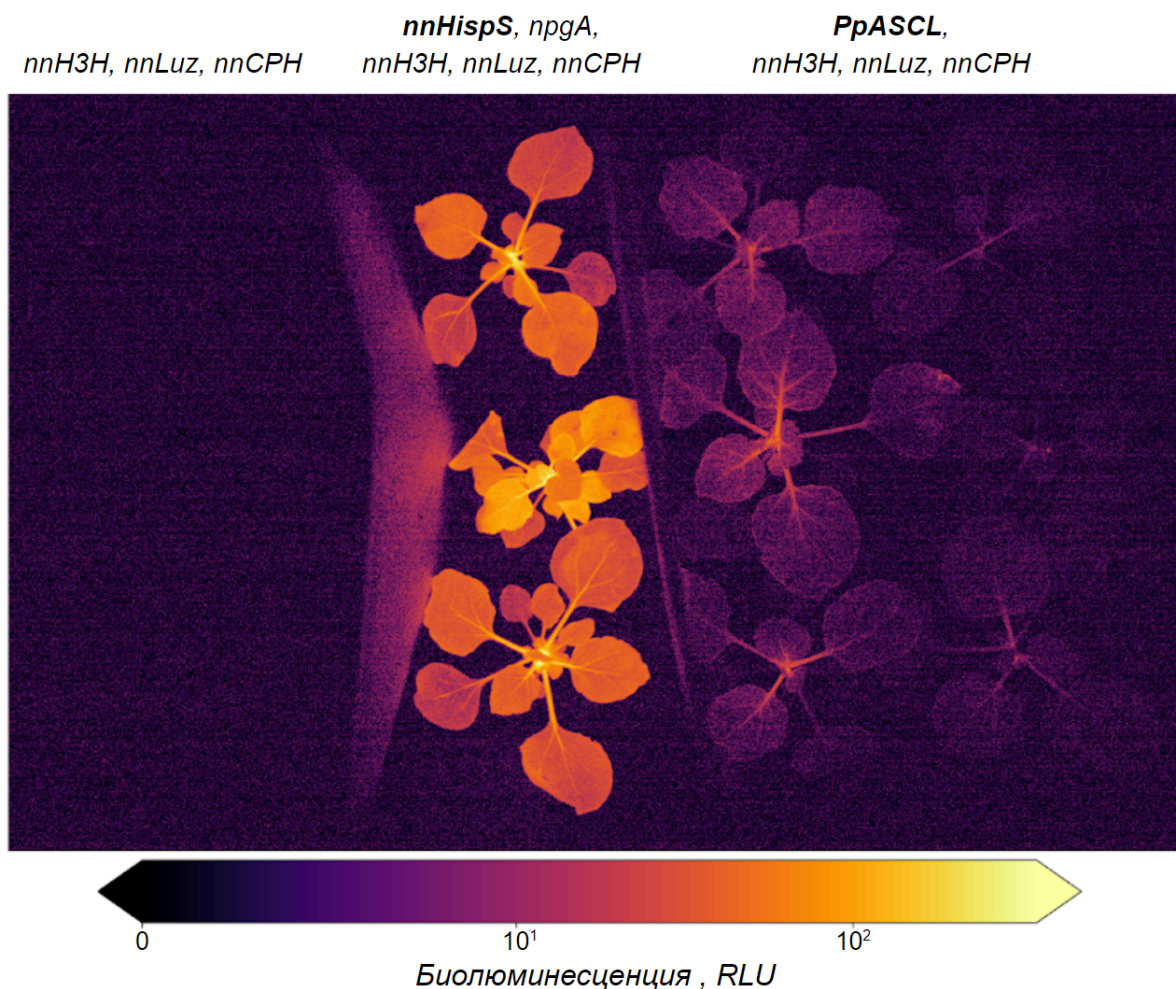
Данная работа была проведена совместно с Татьяной Митюшкиной, Татьяной Каратаевой (Лаборатория молекулярных основ стрессоустойчивости растений, ФИБХ РАН).





**Рисунок 35.** Трансгенные растения *N. benthamiana*, экспрессирующие разные варианты биоллюминесцентного 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*. Для фотографий использованы псевдоцвета (шкала – в правой части рисунка)





**Рисунок 36.** Трансгенные растения *N. benthamiana*, экспрессирующие разные варианты биолуминесцентного пути. 5-6 недельные растения, экспрессирующие гены *nnLuz*, *nnH3H* и *nnCPH*, а также *nnHispS* с *npgA* или *PpASCL*.

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

Отличие в уровне свечения стабильных линий *N. benthamiana*, которые мы получили, может отражать разный механизм работы ПКС растений и *nnHispS*, поэтому мы предположили ряд возможных причин. Во-первых, это может быть следствием разной эффективности ферментов самих по себе, отличием их биохимических характеристик и особенностью механизма катализируемой реакции. Во-вторых, могут играть важную роль отличия в субстратной специфичности ПКС и *nnHispS*, ведь известно, что в растениях большое разнообразие гидроксикоричных кислот, которые могут выступать не только потенциальным субстратом ПКС, но и в качестве конкурентного ингибитора. Кроме того, теоретически, ПКС могут, используя широкий круг субстратов, производить соединения, блокирующие следующие

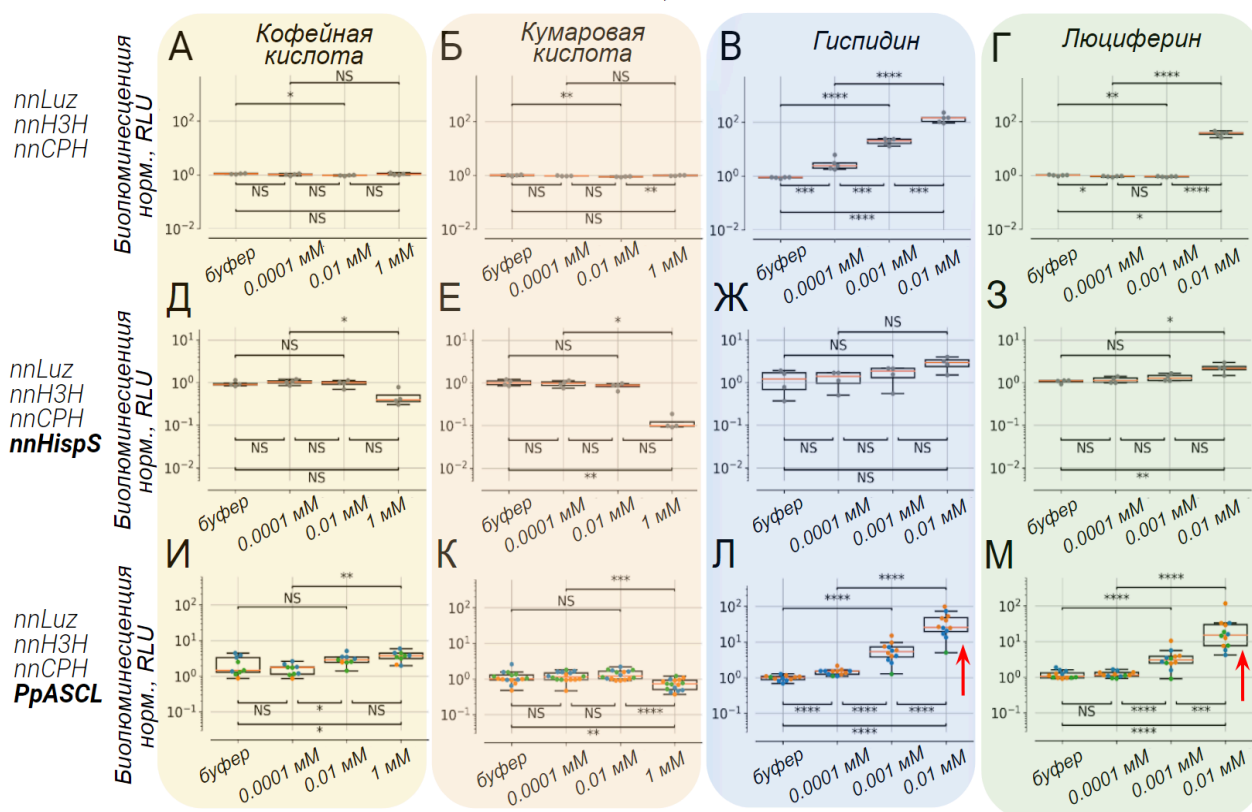
ферменты пути: НЗН или Luz, что также способно снизить уровень биолуминесцентного сигнала. В-третьих, регуляция ферментов фенилпропаноидного пути в растениях может не влиять на nnHispS – фермент из таксономически отдалённого организма, но затрагивать ПКС – белок растительного происхождения – вызывая его деградацию или ингибирование. В-четвертых, разная локализация ферментов биолуминесцентного пути может затруднять транспорт промежуточных соединений между ферментами каскада и приводить к снижению уровня свечения в случае ПКС. Некоторые из этих гипотез мы проверили и описали ниже.

Таким образом, мы продолжили исследование стабильной линии *N. benthamiana*, экспрессирующей гены ферментов гибридной биолуминесцентной системы. Первый анализ включал поиск лимитирующей реакции путем инъекции в листья стабильных линий метаболитов биолуминесцентного пути: кофейной кислоты, гиспидина и люциферина. Мы также инъектировали кумаровую кислоту, близкую по структуре к кофейной, для проверки эффекта ингибирования ею ПКС и nnHispS. Согласно опубликованным данным, концентрация кофейной и кумаровой кислот может варьировать в диапазоне 10-100 мкМ (Chaowuttikul и др., 2020; Mitiouchkina 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, nnHZN, nnCPH. В данной линии, как и ожидалось, биолуминесценция развивалась при инъекции люциферина и гиспидина, но не кофейной и кумаровой кислот (рис.37).

Анализ инъекций кофейной кислоты показал, что линии, экспрессирующие ПКС растений или nnHispS реагируют на повышенную концентрацию кофейной кислоты по-разному (повышением и понижением сигнала, соответственно). При этом увеличения яркости незначительное и только в ответ на высокую, нефизиологичную (1 мМ) концентрацию кофейной кислоты. Это может указывать на то, что доступность кофейной кислоты не является лимитирующим фактором для биолуминесценции. При этом инъекции как гиспидина, так и люциферина приводят к росту биолуминесценции для линий с PpASCL более, чем в 10 раз уже в концентрации 10 мкМ, что указывает на то, что биосинтез гиспидина является лимитирующей стадией в этих линиях. Инъекция кумаровой кислоты в высоких концентрациях приводила к снижению сигнала для обеих линий, что может указывать на ингибирование PpASCL и nnHispS данным субстратом.

*Nicotiana benthamiana*, листья стабильных линий



**Рисунок 37.** Инъекции кофейной и кумаровой кислот, гиспидина и люциферина в листья линий *N. benthamiana*, конститутивно экспрессирующих гены *nnLuz*, *nnH3H*, *nnCPH* без поликетидсинтазы (А-Г), с *nnHispS* и *NpgA* (Д-З) или с *PpASCL* (И-М).

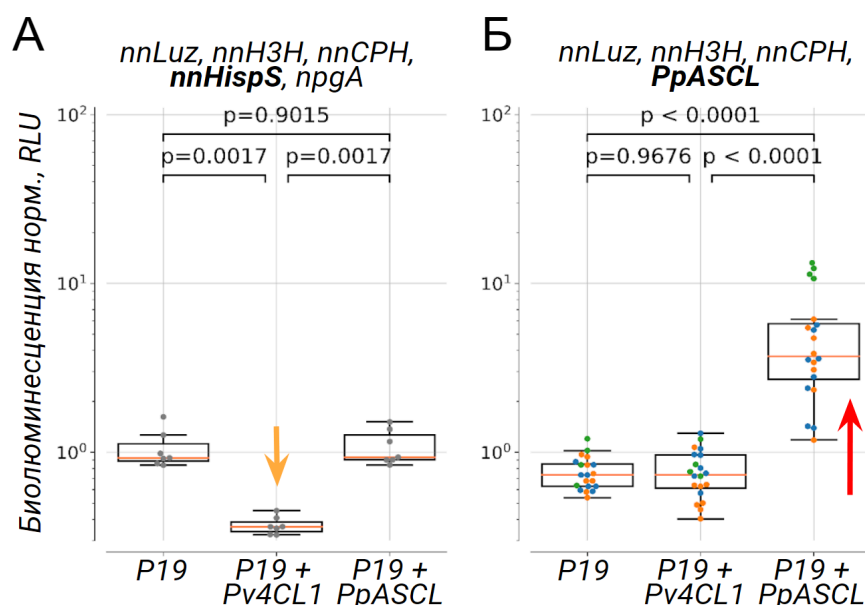
### 3.10.8 Анализ агроинфильтраций для экспрессии генов ПКС и 4CL в стабильных линиях *N. benthamiana* для определения лимитирующей стадии

Предположив, что лимитирующей стадией является биосинтез гиспидина, мы решили рассмотреть ее более подробно. В случае гиспидинсинтазы *N. nambi* субстратом для производства гиспидина является непосредственно кофейная кислота. При этом для ферментов из растений, биосинтез гиспидина разделяется на два этапа: образование КоА-тиоэфира, катализируемое 4CL, и его трансформация в гиспидин, что катализирует ПКС. Какая из стадий определяет скорость биосинтеза гиспидина, не известно. Таким образом, мы решили это исследовать путем агроинфильтраций стабильных линий *N. benthamiana* для достижения высокого уровня экспрессии *PpASCL* и *Pv4CL1*.

По результатам работы мы выяснили, что довкол смеси агробактерий для повышения экспрессии *PpASCL*, но не *Pv4CL1* приводит к увеличению уровня

биolumинесценции (рис.38). Это говорит о том, что именно стадия, катализируемая ПКС, лимитирует биосинтез гиспидина. Кроме того, любопытно, что агроинфильтрация Pv4CL1 снижает уровень сигнала линии, стабильно экспрессирующей ген nnHispS, что может отражать конкуренцию этих ферментов за субстрат – кофейную кислоту.

*Nicotiana benthamiana*, листья стабильных линий



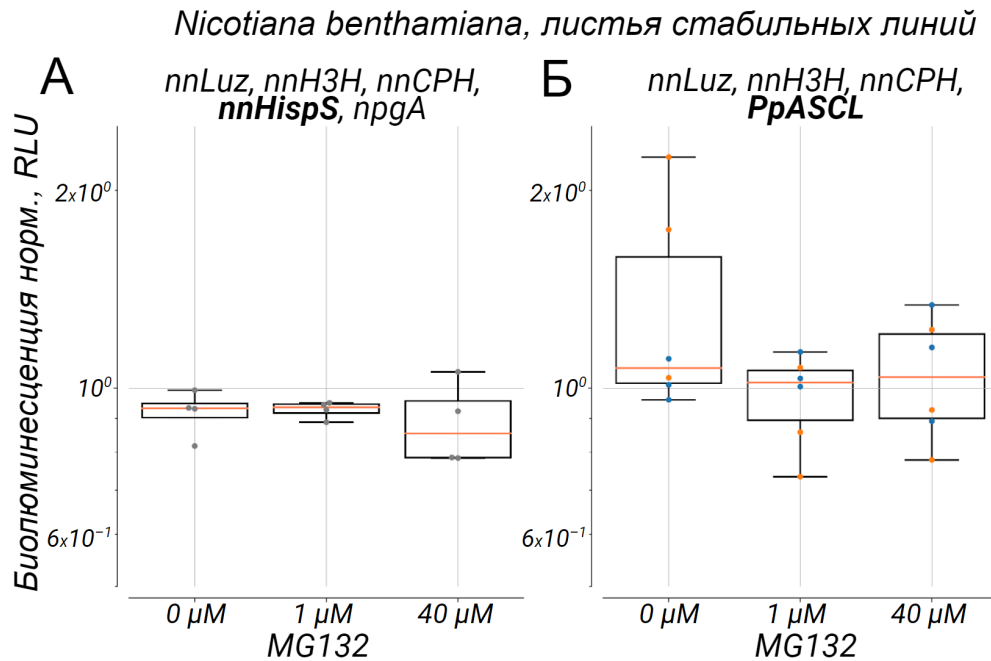
**Рисунок 38.** Временная экспрессия PpASCL и Pv4CL1 (P19 в качестве контроля) в листьях стабильных линий *N. benthamiana*, экспрессирующих nnLuz, nnH3H, nnCPH (А), с nnHispS и NpgA (Б) или PpASCL (В).

### 3.10.9 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 (Gu и др., 2019; Мао и др., 2022). В работах для подтверждения такого способа регуляции использовали ингибитор 26S-протеасомной деградации – MG132 (Lyzenga и др., 2012), который мы также проанализировали в нашей работе.

Мы производили инъекции MG132 в стабильные линии *N. benthamiana*, экспрессирующие гены ПКС и nnHispS с NpgA совместно с другими генами ферментов биolumинесцентного пути: nnLuz, nnH3H, nnCPH, и производили съемку в течение 16 ч. Согласно полученным результатам добавление ингибитора

убиквитин-зависимой деградации не привело к росту сигнала (рис.39). Это может свидетельствовать о том, что такой деградации ПКС не происходит или она вносит небольшой вклад в регуляцию работы данного фермента на стабильных линиях.



**Рисунок 39.** Проверка гипотезы убиквитин-зависимой деградации ПКС. Интегральный биолюминесцентный сигнал за 16 ч после инъекции ингибитора MG132 в концентрациях 0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , которые проводили в листья *N. benthamiana*, стабильно экспрессирующие Luz, H3H, CPH 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 NpgA, значительно сократив размер генетической конструкции для автономной биолюминесценции. При этом наиболее яркий сигнал регистрировали для фермента из мха (*Physcomitrella patens*);
7. Анализ стабильных линий *N.benthamiana* показал, что гибридная биолюминесцентная система функциональна на разных этапах развития растения, а стадия, катализируемая поликетидсинтазой III типа является лимитирующей.

## Приложение

**Таблица 1.** Выбранные кандидаты ПКС III типа из растений, анализируемые в данной работе.

Таксономия растения хозяина ПКС	Название растения источника ПКС	Аминокислотная последовательность гена	Описанные продукты ПКС
<p><i>Клада: Сосудистые растения (Tracheophyta)</i></p> <p><i>Отдел: Цветковые (Angiospermae)</i></p> <p><i>Класс: Двудольные (Eudicotes)</i></p> <p><i>Клада: Розиды (Rosidae)</i></p> <p><i>Порядок: Мальвовые (Malvales)</i></p> <p><i>Семейство: Тимелеевые (Thymelaeaceae)</i></p> <p><i>Род: Аквилария (Aquilaria)</i></p>	<p><i>Aquilaria sinensis</i></p> <p>AsPKS1 (X. Wang и др., 2017)</p>	<p>MGSQDVAGGALKGVNPGKATILALG KAFPYQLVMQEFLVDGYFKNTSCKD QELKQKLARLCKTTTVKTRYVVMSE EILNKYPELAVEGIPTLKQRLDIGNEA LTEMAIEASQACIKKWGRPASEITHL VYVSSSEARLPGGDLYLAQGLGLSP RTKRVLVYFMGCSGGVAGLRVAKDI AENNPGRVLLATSETTIVGFKPPSA HRPYDLVGVALFGDGAGAMVIGSDP LPGTESPLFELHTAIQNFLPNTTEKTID GRLTEEGISFKLARELPQIVEDHIEGF CGQLTGVLGSHKQYNKMFVAVHPG GPAILNRVEKRLDLHPNKLDAARRAL EDYGNASSNSIVYVLDYMIETLKM KTESLEPSEWGLILAFGPGVTFEGILA RNLA</p>	Синтез гидроксистирилпироновых соединений
	<p><i>Aquilaria sinensis</i></p> <p>AsPKS2 (X. Wang и др., 2017)</p>	<p>MSQAIADNAYRHHLKRAPTPGKATV LALGKAFPKQVIPQENLVEGYIRDTK CEDVSIKEKLERLCKTTTVKTRYTV MSKEILDNYPELVTEGSPTIRQRLEIA NPAVVEMAKEASLACIKQWGRPAGD ITHIVYVSSSEIRLPGGDLYLANELGL KNDINRIMLYFLGCGYGGVTGLRVAK DIAENNPGRILLTSETTILGFRPPNK SRPYDLVGAALFGDGAAAVIIGANPE IGRESPFMELNFALQQFLPGTHGVID GRLSEEGINFKLGRDLPQKIEDNIEDF CRKLMIKADGDLKEFNELFWAVHPG GPAILNRLESILDLKNGKLECSRRAL MDYGNVSSNTIFYVMEYMREELKRE GSEEWGLALAFGPGITFEGILLRSL</p>	
<p><i>Клада: Сосудистые растения (Tracheophyta)</i></p> <p><i>Отдел: Цветковые (Angiospermae)</i></p> <p><i>Класс: Двудольные (Eudicotes)</i></p> <p><i>Клада: Астериды (Asteridae)</i></p> <p><i>Порядок: Кизиоцветные (Cornales)</i></p> <p><i>Семейство: Гортензиевые (Hydrangeaceae)</i></p> <p><i>Род: Гортензия (Hydrangea)</i></p>	<p><i>Hydrangea macrophylla</i></p> <p>HmS (Akiyama и др., 1999)</p>	<p>MATKSVAVEEMCKAQKAGGPATILAI GTAVPSNCCYYQSEYDFYFRVTKSDH LTDLKSFKRMCESSIKKRYMHILTE EILEENPNMCTFAAPSIDGRQDIVVK EIPKLAKAASKAIKEWQPKSNITH LVFCTTSGVDMPGCDYQLTRLLGLR PSIKRLMMYQQGCHAGGTGLRLAK DLAENNKGARVLVVCSEMTVINFRG PSEAHMDSLVGQSLFGDGASAVIVGS DPDLSTEHPYQIMSASQIIVADSEGA IDGHLRQEGLTFHLRKDVPSLVSDNI ENTLVEAFTPILMDSIDSIIDWNSIFWI AHPGGPAILNQVQAKVGLKEEKLRV SRHILSEYGNMSSACVFFIMDEMCK RSMEEGKGTTEGLEWGVLFGEFGPG FTVETIVLHSPVI</p>	Синтез п-кумароил-3-уксусной кислоты
<p><i>Клада: Сосудистые растения (Tracheophyta)</i></p> <p><i>Отдел: Цветковые (Angiospermae)</i></p>	<p><i>Arabidopsis thaliana</i></p> <p>AtPKSA</p>	<p>MSNSRMNGVEKLSKSTRRVANAGK ATLLALGKAFPSQVVPQENLVEGFLR DTKCDDAFIKEKLEHLCKTTTVKTR YTVLTREILAKYPELTTEGSPTIKQRL EIANEAVVEMALEASLGCIKEWGRP VEDITHIVYVSSSEIRLPGGDLYLSAK LGLRNDVNRVMLYFLGCGYGGVTGL</p>	Синтез тетракетид-α-пиринов



<p>Класс: Двудольные (<i>Eudicotes</i>)</p> <p>Клада: Розиды (<i>Rosidae</i>)</p> <p>Порядок: Капустоцветные (<i>Brassicales</i>)</p> <p>Семейство: Крестоцветные (<i>Brassicaceae</i>)</p> <p>Род: Резуховидка (<i>Arabidopsis</i>)</p>	(Colpitts и др., 2011)	RVAKDIAENNPGRVLLTSETTILGF RPPNKARPYDLVGAALFGDGAAAVII GADPRECEAPFMELHYAVQQFLPGT QNVIEGRLTEEGINFKLGRDLPGKIEE NIEEFCKKLMGKAGDESMFNDMF WAVHPGGPAILNRLETKLKLEKEKLE SSRRALVDYGNVSSNTILYVMEYMR DELKKKGDAQAQEWGLGLAFGPGITF EGLLIRSLTSS	
<p>Отдел: Моховидные (<i>Bryophyta</i>)</p> <p>Класс: Брионсиды (<i>Bryopsida</i>)</p> <p>Подкласс: Фуринариевые (<i>Funariidae</i>)</p> <p>Порядок: Фуринариевые (<i>Funariales</i>)</p> <p>Семейство: Фуринариевые (<i>Funariaceae</i>)</p> <p>Род: Фискомитрелла (<i>Physcomitrella</i>)</p>	<p><i>Physcomitrella patens</i></p> <p>PpASCL</p> <p>(Colpitts и др., 2011)</p>	MASRRVEAAFDGQAVELGATIPAAN GNGTHQSIKVPGHRQVTPGKTTIMAI GRAVPANTTFNDGLADHYIQEFNLQ DPVLQAKLRRLCETTTVKTRYLVVN KEILDEHPEFLVDGAATVSQRLAITG EAVTQLGHEAATAAIKEWGRPASEIT HLVYVSSSEIRLPGGDLYLAQLLGLR SDVNRVMYMLGCGYGGASGIRVAKD LAENNPGRVLLITSECTLIGYKSLSP DRPYDLVGAALFGDGAAAMIMGKD PIPVLERAFFELDWAGQSFIPGNKTI DGRLEEGISFKLGRLEPKLIESNIQG FCDPILKRAGGLKYNDIFWAVHPGGP AILNAVQKQLDLAPEKLQATARQVLR DYGNISSSTCIYVLDYMRHQSLKLKE ANDNVNTEPEWGLLLAFGPGVTIEG ALLRNLC	Синтез тетракетид- $\alpha$ -пир онов, халконсинтаза специфичная для пыльников
<p>Клада: Сосудистые растения (<i>Tracheophyta</i>)</p> <p>Отдел: Цветковые (<i>Angiospermae</i>)</p> <p>Класс: Двудольные (<i>Eudicotes</i>)</p> <p>Порядок: Гвоздичноцветные (<i>Caryophyllales</i>)</p> <p>Семейство: Гречишные (<i>Polygonaceae</i>)</p> <p>Род: Рейнутрия (<i>Reynoutria</i>)</p>	<p><i>Polygonum cuspidatum</i></p> <p>PcPKS3</p> <p>(Y.-W. Guo и др., 2013)</p>	MAPAVADIRKAQRAEGPATVLAIGTA TPPNCVYQKDYDPYYFRVTNSDHMT DLKEKFRRMCEKSNIEKRYMYLTEEI LKENPNMCSYMQTSSLDTRQDMVV SEVPRLGKEAAQKAKEWGQPKSKI THVIMCTTSGVDMPGADYQLTKLLG LHPSVKRFMMYQQGCFAGGTVLR AKDLAENNRGARVLVVCSEITAICFR GPTDTHPDSMVGQALFGDGSAGVIIG ADPDLSEIKPIFELVWTAQTILPDSEG AIDGHLREVGLTFHLLKDVPGGLISK IEKNLTEAFSPLNVSDWNSLFWIAHP GGPAILDQVETKLGLEEKLKATRQ VLNDYGNMSSACVLFIMDEMRRKS VENGHATTGELEWGVLFPGPGILT VETVVLHSPVAN	Синтез биснорьянголина
	<p><i>Polygonum cuspidatum</i></p> <p>PcPKS2</p> <p>(L.-Q. Ma и др., 2009)</p>	MAASIEEIRKEQTPATVLAIGTANPPN CLYQADFPDYFRITKSDHLHLKQKQK FKRICENSRIEKRYFQLTEETIKENPN GAYEAPSLNARHKIQVKGVAELGKE AALEAIKEWGQPKSKITHLIVCCLAG VDMPGTDYQLTKLLDLHPTVKRFMF YHLGCVAGGTVLR LAKDIAENNKGA RVLIVCSEMTAICFRGPSETNISSMIG TSVLGDGAAAVIVGANPDLTVERPIF ELVWTAQTIVPESDGAVEGHLLSGL SCHLSKTLPVLISNNIEACLSEAFTPL NISDWNSLFWITHPGGPAILDHVEAA TGLNKEKLLKATRQVLNDYGNMSSAT VFFIMDKMRKRSLENGRATTGEGLE WGVLFGIGPGVTVETVVLRSVPPIH	Синтез лактона кумароилтриуксу сной кислоты и пирона биснорьянголино вого типа
<p>Клада: Сосудистые растения (<i>Tracheophyta</i>)</p> <p>Отдел: Цветковые (<i>Angiospermae</i>)</p> <p>Класс: Двудольные (<i>Eudicotes</i>)</p> <p>Порядок: Гвоздичноцветные (<i>Caryophyllales</i>)</p> <p>Семейство: Гречишные (<i>Polygonaceae</i>)</p>	<p><i>Rheum palmatum</i></p> <p>RpBAS_L132</p> <p>S (Shimokawa и др., 2010)</p>	MATEEMKKLATVMAIGTANPPNCRY QADFPDFYFRVTNSDHLINLKQKFKR LCENSRIEKRYLHVTEELKENPNIAA YEATSLNVRHKMQVKGVAELGKEA ALKAKEWGQPKSKITHLIVCCSAGV DMPGADYQLTKLLDLDPVSRKFMFY HLGCVAGGTVLR LAKDIAENNKGAR VLIVCSEMTTTCFRGPSETHLDSMIG QAILGDGAAAVIVGADPDLTVERPIF ELVSTAQTIVPESHGAIEGHLLSGLS FHLYKTVPTLISNNIKTCLSDAFTPLN ISDWNSLFWIAHPGGPAILDQVTAKV GLEKEKLVTRQVLKDYGNMSSAT VFFIMDEMRRKSLENGQATTGEGLE WGVLFGFGPGITVETVVLRSVPVIS	Синтез бензальацетона



Род: Ревень ( <i>Rheum</i> )			
<p>Клада: Сосудистые растения (<i>Tracheophyta</i>)</p> <p>Отдел: Цветковые (<i>Angiospermae</i>)</p> <p>Класс: Двудольные (<i>Eudicotes</i>)</p> <p>Порядок: Гвоздичноцветные (<i>Caryophyllales</i>)</p> <p>Семейство: Гречишные (<i>Polygonaceae</i>)</p> <p>Род: Ревень (<i>Rheum</i>)</p>	<p><i>Rheum tataricum</i></p> <p>RtSTS</p> <p>(Samappito и др., 2003)</p>	<p>MAPEESRHAETA VNRAATVLAIGTA NPPNCYYQADFPDFYFRATNSDHLT HLKQKFKRICEKSMIEKRYLHLTEIL KENPNIASFEAPSLDVRHNIQVKEVV LLGKEAALKAINEWGQPKSKITRLIV CCIAGVDMPGADYQLTKLLGLQLSV KRFMFYHLGCYAGGTVLR LAKDIAE NNKEARVLIVRSEMPICFRGPSETHI DSMVGQAIFGDGAAVIVGANPDLSI ERPFI FELISTSQTIPESDGAIEGHLLEV GLSFQLYQTVPSLISNCIETCLSKAFT PLNISDWNSLFWIAHPGGRAILDDIE ATVGLKKEK LKATRQVLNDYGNMS SACVFFIMDEMRRKSLANGQVTTGE GLKWGVLF GFGPGVTVETVVLSSVP LIT</p>	Синтез ресвератрола и других стильбенов
<p>Клада: Сосудистые растения (<i>Tracheophyta</i>)</p> <p>Отдел: Цветковые (<i>Angiospermae</i>)</p> <p>Класс: Однодольные (<i>Monocotyledones</i>)</p> <p>Клада: Коммелиниды (<i>Commelinids</i>)</p> <p>Порядок: Коммелиноцветные (<i>Commelinales</i>)</p> <p>Семейство: Гемодоровые (<i>Haemodoraceae</i>)</p> <p>Род: Вахендорфия (<i>Wachendorfia</i>)</p>	<p><i>Wachendorfia thyrsiflora</i></p> <p>WtPKS1</p> <p>(Brand и др., 2006)</p>	<p>MASTEGIQAYRNNMAEGPATIMAIGT ANPPNVVDASTFPDYYWRVTNSEHL SPEYRVKLKRICERSSIRKRHLVLTEQ LLKENPTLT TYVDASYDERQSVLDA VPKLACEAAAKAIKEWGRPKTDITH MVVCTGAGVDVPGVDYKMMNLLG LPPTVNRVMLYNVGCHASGTVLR I A KDLAENNKGARVLVVSSEVSVMFFR GPAEGDVEILLGQALFGDGSAAIIVG ADPIEGVEKPIFQIFSASQMTLPEGEH LVAGHLRELGLTFHLKPQLPNTVSSN IHKPLKKA FEPLNITDWSIFWIVHP GGRAILDQVQEKIGLEENKLDVSR Y VLAENGNMMSASVFFIMDEMRRKS AAQGCSTTGEGHEWGVLF GFGPGLS IETVVLH SVPLSI</p>	Синтез тетракетид $\alpha$ -пирона
<p>Клада: Сосудистые растения (<i>Tracheophyta</i>)</p> <p>Отдел: Папоротниковидные (<i>Polypodiophyta</i>)</p> <p>Класс: Папоротниковые (<i>Polypodiopsida</i>)</p> <p>Подкласс: Хвоцевые (<i>Equisetidae</i>)</p> <p>Порядок: Хвоцевые (<i>Equisetales</i>)</p> <p>Семейство: Хвоцевые (<i>Equisetaceae</i>)</p> <p>Род: Хвощ (<i>Equisetum</i>)</p>	<p><i>Equisetum arvense</i></p> <p>транскрипт EU17351 с добавленным и 36 аминокислота ми из оксоглутарат-зависимой диоксигеназы из <i>Picea sitchensis</i> EaPKS1</p>	<p>MALQSESQA CLGIDA AFILSPEHRPN AKQCEFTLDQLPVIDLHGLDQPITRQ QIVEQIGQACREWGFFQVSNHGLPA ELMQSMRDETRAFFALPMEKNKLN RHEGNAIGYADIEITKSIRNWREVF D VAASGEMHMPATYDPADDSIDRHITR WPEHPSSFRPTCEKYLEATQGLALNL LELVCESLGVNPRRLHQYFEGNNTS HIRLNHYNACPQPELV LGVGPHQDS GAITVLAVDESVEGLEIKSNKDGQWI RVKDVHPSAFIINLGDMLKVWSNDK YEAVEHRVVTNSAKDRISIVFFLKPS YRADVMPLAELVDEENPPRYETVN WGRFFKRRIDANYRKPGIVVQQLHN FAINRD</p>	Не сообщается

	<i>Equisetum arvense</i> транскрипт EU01786 EaPKS2	MTVLEESADASSRRLAQRANGPATV LAIGTANPANVFEQSSYPDFYFDITNS QHMTCLKKFSRMCQKSGIKKRYM HLNSEILKANPSLCAYWEKSLDVRQ DIAVVEVPKLGKEASLKAKEWGQP KSKITHLVFCTTSGVDMPGADWALT KLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGT VLRVAKDLAENNKGARVLVVCSEIT CVTFRGPSETHLDSL VGQALFGDGA AAVILGSDPLPEENPCFELHWSGSNIL PDSGDAIDGHLREVGLTFHLMKDVP GIISKNIGKVLNDAFRSAFDESGNAE DRPASVNDIFWIAHPGGPAILDQVEE KMKLAPEKMRATRDVLSEYGNMSS ACVLFIMDHMRMSAQNKLTQTGE GLDWGVLLGFGPGLTVETVLLKSIRL AC	Не сообщается
	<i>Equisetum arvense</i> транскрипт EU19726 с добавленным и 32 аминокислота ми из <i>Equisetum arvense</i> транскрипта EU19494 EaPKS3_mut	MTILQESSAASPRRLAQRADGPATVL AIGTANPLTAYEQANYPDFYFGITNS NHMTDLKEKFSRMCCEKSGIKKRYLH LTEEILKANPSMCGYWEKSLDVRQD IVVVEVPMLARQASIKAIKEWGQPK SKITHLVFCTTNGLDMPGADWKLT LLGLHPNVKRLMIYQQGCFAGGT MRIAKDLAENNKDARVLVVCSEINL STFRGPSDIHLDSL VGQALIGDGASA MIIGSDPIPKVETPWFEHWSGSTILP ESNGAIDGHLREVGLIFHLSKDVPRII SKNIGVLLTDAFEKAFLGGKEAPPSY NDVFWIAHPGGPAILDQIEAKLQK MEKMHASRSILSEYGNMSSASVIFIM DYMRRQAVEKKLATTGGLDWGVLL LGFGPGLTVETILLKSVNLCN	Не сообщается
	<i>Equisetum arvense</i> транскрипт EU19726 EaPKS3	MTDLKEKFSRMCCEKSGIKKRYLH EELKANPSMCGYWEKSLDVRQDIV VVEVPMLARQASIKAIKEWGQPKSK ITHLVFCTTNGLDMPGADWKLT GLHPNVKRLMIYQQGCFAGGTVMRI AKDLAENNKDARVLVVCSEINLSTFR GPSDIHLDSL VGQALIGDGASAMIIG SDPIPKVETPWFEHWSGSTILPESNG AIDGHLREVGLIFHLSKDVPRISKNI GVLLTDAFEKAFLGGKEAPPSYNDV FWIAHPGGPAILDQIEAKLQKMEK MHASRSILSEYGNMSSASVIFIMDY MRRQAVEKKLATTGGLDWGVLLGF GPGLTVETILLKSVNLCN	Не сообщается
Клада: Сосудистые растения (Tracheophyta) Отдел: Цветковые (Angiospermae) Клада: Магнолииды (Magnoliids) Порядок: Перечноцветные (Piperales) Семейство: Перечные (Piperaceae)	<i>Piper methysticum</i> PmSPS1 (Pluskal и др., 2019)	MSKTVEDRAAQRAGPATVLAIGTA TRANVVYQTDYDPDYFRVTKEHMT KLKNKFQRMCDRSTIKKRYMVLTEE LLEKNLSLCTYMEPSLDARQDILVPE VPKLGKEAADEAIAEWGRPKSEITHL IFCTTCGVDMPGADYQLTKLLGLRSS VRRTMLYQQGCFGGGTVLRKADL AENNAGARVLVVCSEITTAVNFRGPS DTHLDLLVGLALFGDGA AVIVGAD PDPTLERPLFQIVSGAQTILPDSEGA I NGHLREVGLTIRLLKDVPGLVSMNIE KCLMEAFAPMGIHWDNSIFWIAHPG GPTILDQVEAKLGLKEEKLKSTRAVL REYGNMSSACVLFILDEVKRKSMEE	Синтез гиспидина описан (не подтвержден в данной работе)

<p><i>Род: Перец (Piper)</i></p>	<p><i>Piper methysticum</i> PmSPS2 (Pluskal и др., 2019)</p>	<p>GKTTTGEFDFWGVLFDFGPGFTVET VVLHSMPIKADGRSG MSKMVEEHWAAQRARGPATVLAIG TANPPNVLYQADYPDFYFRVTKSEH MTQLKEKFKRICDKSAIRKRLHLTE ELLEKNPNICAHMAPSLDARQDIAV EVPKLAKEAATKAKEWGRPCKSDITH LIFCTTSGVDMPGADYQLTTLGLRP TVRRTMLYQQGCFAGGTVLRHAKDF AENNRGARVLAVCSEFTVMNFGSPS EAHLDSMVGMAFGDGASAVIVGA DPDFAIERPLFQLVSTTQTIVPDSGA IKCHLKEVGLTLHLVKNVPDLISNM DKILEEAFAPLGIRDWNSIFWTAHPG GAAILDQLEAKLGLNKEKLKTRTV LREYGNMSSACVCFVLDEMRRSSLE EGKTTSGEGLEWGLLGFPGTLVET VVLRSVPISTANSNG</p>	<p>Синтез гиспидина описан (не подтвержден в данной работе)</p>
<p><i>Клада: Сосудистые растения (Tracheophyta)</i> <i>Отдел: Цветковые (Angiospermae)</i> <i>Класс: Двудольные (Eudicotes)</i> <i>Порядок: Гвоздичноцветные (Caryophyllales)</i> <i>Семейство: Плюмбаговые (Plumbaginaceae)</i> <i>Род: Свинчатка (Plumbago)</i></p>	<p><i>Plumbago zeylanica</i> PzPKS2 (Sakamoto и др., 2021)</p>	<p>MAPSVVEIRKAQRAQGPATVLAIGTA TPPNCVYQKDYPDYFRVTNSEHMT ELKEKFRMRCDKSMIEKRYMLLTED LLKENPSMCAYMGSLLDARQDLVVA EVPRLGKEAAQKAKEWGPQPSKIT HVIMCTTSGVDMPGADYQLTKLLGL RPSVKRFMMYQQGCFAGGTVLRILA KDVAENNKGARVLVVCSEITACFRG PTDTHLDSMVGQALFGDGSGAVIIG ADPDLTVERPIFELVWTAQTILPDSEG AIDGHLREVGLTLHLLKDVPGSLISK ITKALVEAFNPLGISDWNELFWVAHP GGPAILDQVEEKALKEPKMKATRQ VLNDYGNMSSACVLFILDEMRRKSL ENGHSTTGEGLWGVLFDFGPGTLV ETVVLHSPVNVN</p>	<p>Синтез биснорьянголина</p>
<p><i>Клада: Сосудистые растения (Tracheophyta)</i> <i>Отдел: Цветковые (Angiospermae)</i> <i>Класс: Двудольные (Eudicotes)</i> <i>Клада: Астериды (Asterids)</i> <i>Порядок: Пасленоцветные (Solanales)</i> <i>Семейство: Пасленовые (Solanaceae)</i> <i>Род: Табак (Nicotiana)</i></p>	<p><i>Nicotiana tabacum</i> NtPKS1 (Lin, 2012)</p>	<p>MSQNGKNINGASKYFFQPSTRLPTPG KSTILAMGKAFAQLVPQDCLVEGYI RDTNCQDLAIKEKLERLCKTTTVKT RYTVMSKEILDKYPELATEGTPTIKQ RLEIANPAVVEMAKQASQACIKEWG RSAEEITHIVYVSSSEIRLPGGDLYLA TELGLRNDIGRVMLYFLGCGYGGVTG LRVAKDIAENNPGRVLLTSETTILG FRPPNNARPYDLVGAALFGDGAAGV IIGTEPIVGKESPFMELNFATQQFLPG TNNVIDGRLTEEGINFKLGRDLPEKI QDNIEEFCKKLMAKADLKETKYNDL FWAVHPGGPAILNRENTLKLQSEKL DCSRRALMDFGNVSSNTIFYVMEYM REELKNKKDEGEWGLALAFGPGIT FEGILLRSLLEARNL</p>	<p>Синтез биснорьянголина и родственных трикетидпионов</p>
<p><i>Клада: Сосудистые растения (Tracheophyta)</i> <i>Отдел: Цветковые (Angiospermae)</i> <i>Класс: Двудольные (Eudicotes)</i> <i>Клада: Розиды (Rosidae)</i> <i>Порядок: Бобовоцветные (Fabales)</i> <i>Семейство: Бобовые (Fabaceae)</i> <i>Род: Сенна (Senna)</i></p>	<p><i>Cassia alata</i> CalPKS1 (Samappito и др., 2002)</p>	<p>MVKVEEIRKAQRAEGAATVMAIGTA TPANCVEQSTYPDYFRVTNSEHMT ELKEKFQRMCDKSMIKKRYMHLTEE ILKENPNMCAYMAPSIDARQDIVVLE VPKLGKEAATKAKEWGPQPSKITH LIFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRP SVKRYMMYQQGCFAGGTVLRILAKD LAENNKGARVLVVCSEITAVTFRGPS DTHLDSL VGQALFGDGAAGVIVGSD PIPVETPLFELVWTAQTILPDSEGA DGHLEVLTFHLLKDVPGSLISKNE KALVEAFNPLGISDYNFIAHPGG PAILDQVEAKLGLKEPKMQATRHVL SEYGNMSSACVLFIMDEMRRKSTKD GLGTTGEGLWGVLFDFGPGTLVET VVLHSAI</p>	<p>Синтез пионов схожих с биснорьянголино м</p>

<p>Клада: Сосудистые растения (Tracheophyta)</p> <p>Отдел: Цветковые (Angiospermae)</p> <p>Класс: Двудольные (Eudicotes)</p> <p>Клада: Розиды (Rosidae)</p> <p>Порядок: Бобовоцветные (Fabales)</p> <p>Семейство: Бобовые (Fabaceae)</p> <p>Род: Арахис (Arachis)</p>	<p><i>Arachis hypogaea</i></p> <p>AhSTS(Morita и др., 2001)</p>	<p>MVSVSGIRKVVQRAEGPATVLAIGTAN PPNCIDQSTYADYYFRVTNSEHMTDL KKKFQRICERTQIKNRHMYLTTEEILK ENPNMCAYKAPSLDAREDMMIREVP RVGKEAATKAKEWGPMSKITHLIF CTTSGVALPGVDYELIVLLGLDPCVK RYMMYHQGCFAGGTVLRALAKDLAE NNKDARVLIVCSENTAVTFRGPSETD MDSLVGQALFADGAAAIIIGSDPVPE VEKPIFELVSTDQKLVPGSHGAIGGL LREVGLTFYLNKSVPDIIISQNINDALN KAFDPLGISDYNISFIAHPGGRAILD QVEQKVNKPEKMKATRDVLSNYG NMSSACVFFIMDLMRKRSLEEGLKT TGEGLDWGVLFGEFGPLTIETVVLRS VAI</p>	<p>Синтез лактонов кумароилтриуксу с ной кислоты и пиранов схожих с биснорьянгоино м</p>
<p>Клада: Сосудистые растения (Tracheophyta)</p> <p>Отдел: Цветковые (Angiospermae)</p> <p>Клада: Однодольные (Monocotyledones)</p> <p>Клада: Коммелиниды (Commelinids)</p> <p>Порядок: Злакоцветные (Poales)</p> <p>Семейство: Злаковые (Poaceae)</p> <p>Род: Рис (Oryza)</p>	<p><i>Oryza sativa</i></p> <p>OsPKS (Morita и др., 2010)</p>	<p>MAPTTTMGSAlyPLGEMRRSQRAD GLAAVLAIGTANPPNCVTQEEIPDFY FRVTNSDHLTALKDKFKRICQEMGV QRRYLHHTTEMLSAHPEFVDRDAPS LDARLDIAADAVPELAAEAAKKAIA EWGRPAADITHLVVTTNSGAHVPGV DFRLVPLLGLRPSVRRTMLHLNGCFA GCAALRLAKDLAENSARGARVLVVA ELTLMYFTGPDEGCFRTLLVQGLFGD GAAAVIVGADADDVERPLFEIVSAA QTIIPESDHALNMRFTERRLDGVLGR QVPGLIGDNVERCLLDMFGLPGGD GGGGWNDLFWAVHPGSSTIMDQVD AALGLEPGKLAASRRVLSGYGNMSG ATVIFALDELRRQRKEAAAAGEWPE LGVMMAFGPGMTVDAMLLHATSHV N</p>	<p>Синтез бисдиметоксикур кумина</p>

**Таблица 2.** 4-Кумароил-КоА-лигазы, выбранные для работы.

Название растения, источника 4CL	Сокращение 4CL	Аминокислотная последовательность гена	Ссылка на источник
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4CL1	MEEDYKMAPQEQAQVSVMEKQSNNNNSDVIFRSKLDPDIYPNHLSLHDYIFQ NISEFATKPCLINGPTGHVYTSYSDVHVISRQIAANFHKLGVNQNDVVMILLPN CPEFVLSFLAASFRTGATATAANPFFTAEIAKQAKASNTKLIITEARYVDKIKPL QNDDGVVIVCIDDNESVPIPEGCLRFTELTQSTTEASEVIDSVEISPDDVVALPY SSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVDGENPNLYFHSDDVILCVLPMFHIYAL NSIMLCGLRVGAAILIMPKFEINLLELIQRCKVTVPMPVPIVLAIAKSSETEK YDLSSIRVVKSGAAPLGKELEDAVNAKFPNAKLGGYGMTEAGPVLAMSLG FAKEPFPVKSACGTVVRNAEMKIVDPDTGDSLRSNQPGEICIRGHQIMKGYL NNPAATAETIDKDGWLHTGDIGLIDDDDELFIVDRLKELIKYKGFQVAPAELEA LLIGHPDITDVAVVAMKEEAAGEVPVAFVVKSKDSELDVVKQFVSKQVVF YKRINKVFFTESIPKAPSGKILRKDLRAKLANGLSGYPYDVPDYAR	(Costa и др., 2005)
	At4CL2	MTTQDVIQNDQNDQKQCSNDVIFRSRLPDIYPNHLPLHDYIFENISEFAAKPC LINGPTGEVYTYADVHVTSRKLAAAGLHNLGVKQHDVVMILLPNSPEVVLTF AASFIAITTSANPFFTAEISKQAKASAAKLIVTQSRVVDKIKNLQNDGVLI TDSDAIPENCLRFSELTQSEEPVDSIPEKISPEDVVALPFSSGTTGLPKGVMLT HKGLVTSVAQQVDGENPNLYFNRDDVILCVLPMFHIYALNSIMLCSLRVGATI LIMPKFEITLLEQIRCKVTVAMVVPPIVLAIAKSPETEKYDLSSVRMVKSGA APLGKELEDAISAKFPNAKLGGYGMTEAGPVLAMSLGFAKEPFPVKSACG TVVRNAEMKILDPDTGDSLPRNKPGICIRGNQIMKGYLNDPLATASTIDKDG WLHTGDVGFIDDDDELFIVDRLKELIKYKGFQVAPAELESLIGHPEINDVAVV AMKEEDAGEVPVAFVVRKSDNSEIDEIKQFVSKQVVFYKRINKVFFTDSPK APSGKILRKDLRLARLANGLMNSG	

<i>Nicotiana tabacum</i>	Nt4CL2	MEKDTKQVDIIFRSKLPDIYIPNHLPLHSYCFENISEFSSRPCLINGANKQIYTY ADVELNSRKVAAGLHKQGIQPKDTIMILLPNSPEFVFVAFIGASYLGAISTMANP LFTPAEVVKQAKASSAKIIVTQACHVNVKDYAFENDVKIICIDSAPEGCLHFS VLTQANEHDIPEVEIQPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVDG ENPNLYIHSEDMVLCVLPFHIYSLNSVLLCGLRVGAAILMQKFDIVSFLELIQ RYKVTIGPFVPIVLAIAKSPMVDDYDLSSVRTVMGSAAPLKGKELDDTVRAKF PNAKLGQGYGMTEAGPVLAMCLAFAPKEFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPK TGNSLPRNQSGEICIRGDQIMKGYLNDPEATARTIDKEGWLYTGDIGYIDDDD ELFIVDRLKELIKYKGFQVAPAELEALLNHPNISDAAVVPMKDEQAGEVPVA FVVRNSNGSTITEDEVKDFISKQVIFYKRIKRVFFVDAIPKSPSGKILRKDLRAKL AAGLPNSG	(Z. Li и Nair, 2015)
<i>Panicum virgatum</i>	Pv4CL1	MGSVDESAAAEVFRSKLPDIEINNSQPLHAYCFGKMPVAGRPCLIDGQTGA SYTYAEVESLSRRAAAGLRRMGVKGDDVMSLLRNCPEFAFAFLGAARLGA ATTTANPFYTPHEIHRQAEAAGAKLIVTEACAVDKVREFAVAGIPVTVVTDGR FDGCAEFAEVIAAELEADADIQPDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHRSLLTS VAQQVDGENPNLHFRKDDVLLCCLPLFHIYSLNSVLLAGLRAGCAIVMRKFE TGAELVELVRAHGVTVAPFVPIVVEIAKSPRVGAADLASIRMVMSGAAPMGK DLQDAFMAKIPNAVLGGQYGMTEAGPVLAMCLAFAPKEFQVKSQSGCGTVVR NAELKIVDPDTGAALGRNQPGECIRGEQIMKGYLNDPESTKNTIDKDGWLH TGDIGYVDDDDIEFIVDRLKEIKYKGFQVPAELEALLITHPEIKDAAVVSMK DDLAGEIPVAFIVRTEGSQLTEDEIKQFVAKEVVFYKKIHKVFFTD SIPKNPSGK ILRKDLRLARLAAGVHSG	(B. Xu и др., 2011)

Таблица 3. ПКС из неблюминесцентных грибов, выбранные для работы.

Название организма, источника ПКС	Сокращение ПКС	Аминокислотная последовательность гена
<i>Hypholoma sublateritium</i>	hsPKS	MAASLYDKNTLLNAFLGVAHSADVDRNAVEYGNERTWYGDLDTVSTGLALEMHKKYGPKPVVAIVS ENHPYTLAMLFAIWKLGGIAAPLDHNVPKDIMERMLLNIGPTCVLPATERVVQSIVEGISVACHAFNP KEMSTALMQLYLDLSPELTGPFAHLPNPDDIALYLTSSASSVANVKCVPTTHASILGASAARLAWW KRTWPAQQYTHLRVLGWSTWAHVIGLTNDLGAAMVLTAGCYIFAMPPASGAGGNAAALYLDVCGQL LETAIKQPTVFAGVPWVLEGFMRNYKQEADAARKQAIQDAVKRLKVFSGSGASTNAECIEWAIQMA IPLVLDIGMTEVGGPLFHSTIGGPEGWLSSEDCMLPGAQLKLIDDSGAEVSTEGELVVRAQNVTRGYRH YDNSSFTLENDGTVSFKTGDVYAFVGDQRLVWKGKREDYIQMSSGESLDPRVVEAVLDKCPAIARSC VVGNNFLKTSSQVCAIVQPAKNTSTTEITRAISVANRSLAPPLRISWSRVLVLESEGQEVPIITKKGAIFR KKLEELFGAQLGALLSRPEVDIASRAKTKPSASSSRAQKTRDQIASIVSNIVLQTLRISEETMDDNSQ ATFAELGMDSAMSTLIVNKLNRQLDMSLPLNTCHTHIDLVSILTNAISDLGIDASSAKARPSTRVAPPA HEKEIIVGQAVRLPGDINTPDSFWRALIDKREDIITAVPASRWDHASFYRAPDSKEPPAPCDITLEKA GFVDSYSFDDHAFFGISSAEAFHVSPNIRLSMEVAFEALENANIPPSKVKGSNMAVFAASMDDEGYIKLL FADKGWGAYTRFYGTGVATSTACGRLSYLLDVHGPSITIDTACSSGLIAFDQAVQYQLSQGQGESAIVC ANTHAWPGTLGFLSAQKMTSSNSRCATFTNMADGYVPSEAAAGLIMTKSAALRDGDRIIGVVRSTD VQHDGRSQGLVAPNVKAQIAMQIALLEKAQLSPAQIDFIEAHGTGSLGDLIEIQGINEVFEGSHGADK PLVVGAACKSCVGHAEVLVAGLIGVVKTLGSFAKGSVPGVLVQLTADNMNPNIDCSVVPLHIPIEPTVLKTE DNLPLRALILSNGFAGSIAGTILEAPTEDMQPKASANIPETMPMTFVVSGKSQDALNEYLSLYLDFCLD ADSSLFHAICYTTICGREHYRYRFACVVNNMQDLIARLEDRQNTSSTSAGGNARRILLGFPQGQSQY QGMGRYLANQYSGFRTIITEAANKAAGLTGYPLPYLLDESAPKGLTIDHSEVAQVCIFIFYSVATWLE SIGIHAAVVLGHSLGEIAAAVIARTFTLEIGLQFVVERAKLLRADPTRPAGMAALQTTARVAQYIQLL GVEGRVAIAVYNAPDAHVVSGELKAVESVLAALKRDGVRCTKLNVDQGFHSPAVASALPSLKMWLD NHDDAITGLEKPFSTLRGAIEPKHERLDTQYWIAHAKSPVRFYETARVATKASSIDVIVDVGPQPTVW SNMQTPEYAGKARLAFTGKRGKDQIVAMLAALSSLFEGFNVDFDALFSQMPYKFAMTDVPTYPFQR LYNYPAYICTRSSTVASILNQVETSQQKAPTPQFVVDQSLCDFLDLHRIEGRRLVPGAAMVDDFFARAAG SKSVKNVKFHTPLVLETPETQVRAEIDEQGAYKLVDGADTLICSGTISDKRGSLLGRKVAHEPEAVP LQMMTKTQIYECFKNVQFGDPFRTVQAVRIWADYADADIRLEATAYPAGDRIRKLDACLHMFALSS RLAPPVDDNAGAYLPASLEDFTLHTDDMPYKFTCRYLPLDIGRNARVLSSCFEVFSDAGDLLVSCKK YSVAWVPKGVVHKEQKPPQTAPDTWIRNAWTTQNLPAQPTTSVHRFDEIIFYNGETSRVLSLSSSA KNCISVEMPHLPRDESCKIPNNTKVSPEDMNKLPAILRGQDMLVVLDSLKSNNSPGSDQFTALYLQA LMFLKHIMSHKFHISFLALTSWAPVDLYKEGLDLFSDSKVSSASLVGAVVQGMIRVFRRETGLDFAA WCLDLTSIDSLTDSQLQNLTSEIQARYRSEFLDTFCYREDADKKLSRLVPSLESLELVRPARTPSGTTV IVGMGSIGTALAASLVEVGCNPVIFGRRPDSQEKVNNLESALPNVRKQCQYRQVDVCDMEALKKA LADVNAHGGIKNIIHTAAVVTDSIVATKPSDFEAVLLPKVTGSWNHVASQELNLAALDSFVLFSSSTN VIVGNPGQVSVAANSFMDSLATFRHNCGLPGASLQLGAWESRLISDVNMENSFALLMKNDEGLPLIL KAMMAPIPLQIARMDSKLSANPAYAKDPFAPLLSSSNGAAPKDTKAKLSKNAQKILIDILRVALEL QPSEKLDTSSELTALGADSITFAQFKGQVLKEFAVDVPMVYLSDGYTISDMINNVLESYGVASLS

<i>Cortinarius glaucopus</i>	cgPKS	<p>MFCISPPSPQTLTLLDSFLYAARNVETVENDVVECGYEKWSYGDLDVISTGLAIEIKETYGMKPTVATFS  ENHPYILAVMLATWKLGGICAPLDHHTPHELVQHMIINIAPTFVVVPSSDEPIKQLLQGMNVHFMIFDV  RTTSMTSLTQRFLNQSPDLSVEAFPLPSPSDIAFFLHTSSASSISNLKCVPLAHGSVFSGCKSRLTWQK  TWPDKNFMNLRVLGWSPWSHILGISHDIGGATFATAGCYLFLGIPSSYTSQQLTDEYEGEFDIVSRLL  NAVIRLRPDVFSAPVPWVLEGFRDKWSRETADVKKRVMQDVLKMKVFGCGGAALSKEIVLWAKDM  NIPVTVDIGMTELGRPLFYSKADDFDLGWSMKDCLIPDAELRLVSNENCDDDDLLEEGAVELVITSGAIS  QGYLKFDNLAFTKAPDGRRTTFRGTVYTMADDHLMWIGRKEDYIQMVSGETLDPRIERALNTSSA  ISHSCVIGNHFLGRAAGFICVLIPANNKAIQKTPSNAITSEITRAVASVNRTLPPPLRIAWSRVLILDEG  QEVPTTRKGTIFRKKLEGFMFGGQVAGLLENGDVQDNQEKAKVSDYHQEGTASSKWTKVDTVDMV  LKTVAGALQISIAVLSMHSDDSFIEFGMDSNMVAVRIVNELNHLFKLQPLNTCHTYLDELVSLSGAVLTEL  GMNEKVITIEVSTTNPTTVQSHEEVVIVGQALRLPGDINTPESFWQALVDKRDIMTPIPQDRWDQASFY  RSPSSTAPPQDCDITFEKAGFIQVESFDNSFFGISTPEAFYVSPITRLTLETAFAEALENANIPVSRVKGTNM  GIFVAAGLDGGYQQLLYDQGFQAYTRFFGTGIATSTACGRLSYLLDVHGSPITSDDTACSSGLVDFDQA  VKYLQSGDGEAIVCAVNTNLWPGSFGFLSAQKMASPHSRCAFTSSEADGYVSSGAVAFVITSGASAA  LRDGDLSILAVVKSTDIKHGGRSQGLVSPNVNAQIALQSSSLEKAGLPSEIDFVEAHGTGTSGLDLIEIQ  GINQVQFRSHSETPLIVGAACKSCIGHTEVAAGLVGVLKAIASFRHSAIPGLMHLTAENMNPISIDCGIIPM  HIPYELFPLPPKENNTPYRSVVLANGFAGTIAGVILEDPKHVIHSAADLNSINEAETSEDFPMLFVVSASKS  AEALTQYLWKYLDFCRTSSTSDFRSICYTCLGREHYRYRFACVVGSMGSLIKVLELNLVSLSGAVLTEL  PAACRIAFAPPGQGSYQAMASDLVTRYPGFKDILDSAASTASTLSGYPISSFLVDAKTSCDLAIDNSQV  AQICIFYQYSICTWLKQLGIEPRVLGHSLGEIAAAVIGGALPYEIGLNLVTRARLLQCDPTHPGGM  AIVGASQERILYIIHKLGLDDRLVIAVYNDPENHVISGEIKAITDFTLSTANWGFRTKINVDQGAPCISS  ALPALQEWVSGHRHLSPLNIPLYSTVYGKEIRGNQWLSPDYVVEHARDPVRFDDAVEALYSSKSFDDI  VDIGPQLIWTTLQSFSRKNIAIATCGKRSNDQNAAFGLGAIASLFEMDIAPDFGKLLAHKSSQYGGHMC  LPTYPFQQRHYPTSIPIRNSPPPVLPLPVSHNTNPSSIIHFNVQDQSLCDLLDHRIEGHRVAPGASLV  DFFAKLCPVKSVKTIKFNAPLVLDPEAHVVAEFTDGHFFAMVDNHSRTHIVCSGIAASRAPQSYTRQP  INLNPSEQPEQVLTKEIYKVFKNVEFGSAFRNIQYRRWSSHADCLITVEPTEHPHADIRKLDLSCLH  MFGAFSFEVPPQSRDLGAFPLTALEDTLHSDLEPSSFCRYLPLDVSRNFHVMASDAFVLSLALGAL  LVSCRKYSVAWIPVGIAPNHISQPSVNTQWLQSSWVARDLPSAVPDDKLEVLVCIDQAQSQIPSLFNR  MAWKTHFLNLYDLLAPQSFSPLPSLQLQHLAIDRITSTNLLIVVDVTSNHASPTSEAFCSHRHILTL  KLLISSKVRFTSLVFITEMSVAIGNEGNRLAPHLASMTPTVGSVIOGMLRVFRREMGLDEVIWALDL  PPMNTVEDGVILGIISNEICSRHLGLSTDRTVAYRNVDTQKLSRLVPVLQSIGHHPREVSIGTSIVVGLG  SIGHALAPSLAGSHSQVVFIGRRQAHDHEVQEVLLHLQSKTGGRCAVMQADVCDPDSLNRNVIISAQTL  YGPINIVHTAVVVS DATIQT VADKSFELVLRPKVIGAWNLTHTICEELKLPKSFVLLSSVSVPLGNQGG  IAYVAGNAYMETLASYRHSVGLPATCLQLGAWESKLVQNLDFSTGFVRPIKHAKGIPLLLKAMLTPIAV  QVIADFDVEKLASVPAYARDPLFCHILGGAALTQIKTSLRGNLTEDEVADIMIDILRTVLELRPSERLGLS  S</p>
<i>Gymnopilus chrysopellus</i>	gcPKS	<p>MDEVKTLDAFLSVARNPSTIEDPVLECGSEQWSYGDLDICSSGLALKIHHQKCGLKPMAVISENHPFV  LAILLATWKLGGIFAPFDCHSPLEMEVKMLENTEATCAVVPDFEDGLNGLDKMQIPKISYSKNTTITS  LTQLYLAQVAEISPSLYPPDLASLAAYIHTSSASSISNLKCVQLTHEIAYGCRSVIKWFHRAWPSVNF  KLRVLGIAPWSHIMALSYDFGAATFGTGGCYVFGVPPSGYPVGIEVGHVDDSVSGKAEERDILDRLV  DAAVKARPDVLVAVPWVLEGFKERYTRLLGANKEAEALRVKYALQALKCLGSGGAAMSAEMLSWIK  ELKINASSNIGMTELGGLFHRKIDLLSTPDHDDGWSLEDCFFDDVQVLVDEDEGTENDQEGELIITR  HISRGYLYKYNDAFSLPDGSTTFRGTVYERKSDGRIVWKGRKDDYIQTASGETLDPRIEKALSACE  GVLHCCVVGNNFMRKASDAICILIEPAVTADGDSVTLTTEIAQITKLAAMNRLGPPRLIPRWSRVV  LEKGMRIPTYTRKGMIFRKKLESFGLDVVSHLLEKDNLGHLLALNGEINYEEDKKPAKPSAPGIWKTEDV  KSMTVVTIASILGVGTEALRAAPDTTFAEFGMDSNMVAVRIVNELNSTFSLHLPLNACHTSVDLQSMCE  AIMVELGIKGEQQAASSGLCDQPTTNTVKEEVVIVGQALRLPGDINTPDAFWEALINKRNDIMIPVPPDR  WDHASFYRSPTSPPEPQIGDINFELKAGFLDVAHFDNAFFGISTPEAFFVSPSVRLTLETAFAEALENANI  SKVKGTSMGAFVAAGLNEGYPHVLFTSLGWEAYKRTFTGTASSTACGRLSYLLDIHGSPMTTDTAC  SSGLVAFDQAVKYIQSGGGESAMVSAASTALWPGSFGFLSANKMASVNSRCATFTTEADGYVPSEGC  VAFVLKSKTAALRDGDNLAIKSTEVMMHGGSQGLVSPNVKTQIALQRLSLVQAGLPQSEIAFLAEH  GTGTSGLDLIEIQGINEVFKYSHTEDPLILGASKSCIGHTMEASGLVQLLSAIAKLYGVVPLGLVHLNEH  NLNPSIDCDMVPLHIPHEVAPLPRMPETPSRGLILSNGFAGTLAGAIIEGPGNALSGDLQKKQFSALND  QIPMPFVVSATPERLCAYMEKYIAFCRKSTPSDFVNLCTTCVGREHYRYRFACVAHNLPELIATLES  RLQELRYNAQAIGNVAGPRVAFAPGQGSQFQGMASELAHEHFDPFKEIISALSVEASQVSYGDILSFL  DKDSPCEFLVNEGRMGQIGIFVFQSSLASWLRSLGIEPFAVLGHSLGEIAATVTAAGMDFALFKFVIR  AEILCPEFAQSAGMALIAASEETILQRLHELGLEDLHAIACVNGPNSHAVSGNLLAIDSLVTDKAKQGR  ATKLNVTQGFHSPSIYPYLPVLEAWLAGNQHELAPLKLPMYSTVYGRKIAADSELATSYWIEHAKNPV  EFYRAVRELENDKDLNILDIGPQPFITWTLQTLQHKKATISTTKQPQSQNLAFRLGIALLEFGQVTPN  FEKLLQGSRSRGRKISVPTYPFQKQRHYPECIPSRYPVHPKGSTVDRVLEFPIDQGLFDLLADHLIQGHR  VVPAAYLIDFFANKAPSGALQISIFHLPLVLESYDLTVNAEINGNFRFLNLSNDSGGLVCSGILGSRVP  PVLKNGVRDQPPEIKDTADVASFKNVQFGPSFRNVQEIIRTPHADALIAVHSAAHRAPSLDRIRK  LDACLHSLGAITREVPQVRELDGAFPLSSLEGFSLHSDDLPEFVCRYLPLVDVARNYHVISAADFV  SEAGELLVSCKKYSVAWIPTGVTIQKSERNSGSTSEAQSVGWWRQTWVNGKTATEDIGFSKYDQLLAI  SPTERDSRIASLANGISKEVSLPDPLEEVQKFKDSPAVIMLDLTSIDALPMTAEFTSCYRHVLRMLQLLS  SHKIDIREFVVISATSAADVPAGPSAPEVEAPSVAALVQGMVRFRRETGSDDQIWDLDLPRDLTISD  DALRHLLLELEGRQRGKHTDRAVAYRRRDGQEKVERLVPFESVKADEEVGTTYHGVAVITGLGSIG  ASLAQPMVMKGSSKVVYIGRRPVDDTEVQTTLHRLSEIPGRIAYVQADVCELDLSLSAISDIQASHG  PIGSIIHSAAVISDATIQNIDLQSFETVIRPKVVGAWNHLVNLNEELVLLSSISVSLGNPGQAAY  AAANHYIEVLASYRRGKNLPATALQLGPWESKLTQNLDRDSLIPLMNNKRGVPLIISAMSKSDSVQM  IANLDARKLAHPVYSRDPLFYDIVPEQDRLAKSHQARSDEEISTLVANILRKVLELRPSEKLGQSLN  LLLAQLFDNRATLDDSLTICGVDSISFAQVRGRILHELMVEVPMMLSDTFTIHEMIAFVIEKYSSRI  ASLAK</p>

**Таблица 4.** Линии дрожжей и растений, используемые в данной работе.

Организм	ID линии	Экспрессируемые гены
Линии дрожжей <i>Pichia pastoris</i> GS115	ppas1091	<i>nnLuz, nnH3H, npgA, gcPKS WT</i>
	ppas1092	
	ppas1093	
	ppas1112	<i>nnLuz, nnH3H, npgA, gcPKS 2Δ_C</i>
	ppas1113	
	ppas1114	
	ppas1109	<i>nnLuz, nnH3H, npgA, gcPKS 2Δ</i>
	ppas1110	
	ppas1111	
	ppas1100	<i>nnLuz, nnH3H, npgA, hsPKS WT</i>
	ppas1101	
	ppas1102	
	ppas1106	<i>nnLuz, nnH3H, npgA, hsPKS 2Δ_C</i>
	ppas1107	
	ppas1108	
	ppas1103	<i>nnLuz, nnH3H, npgA, hsPKS 2Δ</i>
	ppas1104	
	ppas1105	
	ppas1094	<i>nnLuz, nnH3H, npgA, cgPKS WT</i>
	ppas1095	

	ppas1096	
	ppas1115	<i>nnLuz, nnH3H, npgA, cgPKS 2Δ_C</i>
	ppas1116	
	ppas1117	
	ppas1097	<i>nnLuz, nnH3H, npgA, cgPKS 2Δ</i>
	ppas1098	
	ppas1099	
	ppas603	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, AsPKS1</i>
	ppas604	
	ppas605	
	ppas608	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, AsPKS2</i>
	ppas609	
	ppas610	
	ppas613	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, HmS</i>
	ppas614	
	ppas615	
	ppas619	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, AtPKSA</i>
	ppas620	
	ppas621	
	ppas623	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, PpASCL</i>
	ppas625	



	ppas626	
	ppas802	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, PcPKS3</i>
	ppas803	
	ppas804	
	ppas628	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, RpBAS_L132S</i>
	ppas629	
	ppas630	
	ppas635	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, EaPKS2</i>
	ppas636	
	ppas637	
	ppas638	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, EaPKS3_mut</i>
	ppas639	
	ppas640	
	ppas797	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, PzPKS2</i>
	ppas798	
	ppas799	
	ppas583	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, PcPKS2</i>
	ppas584	
	ppas585	
	ppas598	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, OsPKS</i>
	ppas599	

	ppas600	
	ppas588	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, NtPKS</i>
	ppas589	
	ppas590	
	ppas593	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, AhSTS</i>
	ppas594	
	ppas595	
	ppas578	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1, CalPKS1</i>
	ppas579	
	ppas580	
	ppas558	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, AsPKS1</i>
	ppas559	
	ppas560	
	ppas563	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, AsPKS2</i>
	ppas564	
	ppas565	
	ppas568	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, HmS</i>
	ppas569	
	ppas570	
	ppas573	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, AtPKSA</i>
	ppas574	

	ppas575	
	ppas643	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, PpASCL</i>
	ppas644	
	ppas645	
	ppas247	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, PcPKS3</i>
	ppas257	
	ppas258	
	ppas648	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, RpBAS_L132S</i>
	ppas649	
	ppas650	
	ppas032	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, RtSTS</i>
	ppas033	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, WtPKS1</i>
	ppas034	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, EaPKS1</i>
	ppas653	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, EaPKS2</i>
	ppas654	
	ppas655	
	ppas658	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, EaPKS3_mut</i>
	ppas659	
	ppas660	
	ppas031	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, EaPKS3</i>
	ppas024	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1, PmSPS1</i>

	ppas025	<i>nnLuz, nnH3H, At4CLI, PmSPS2</i>
	ppas483	<i>nnLuz, nnH3H, At4CLI, PzPKS2</i>
	ppas484	
	ppas485	
	ppas222	<i>nnLuz, nnH3H, At4CLI, PcPKS2</i>
	ppas223	
	ppas224	
	ppas228	<i>nnLuz, nnH3H, At4CLI, OsPKS</i>
	ppas229	
	ppas230	
	ppas239	<i>nnLuz, nnH3H, At4CLI, NtPKS</i>
	ppas240	
	ppas241	
	ppas225	<i>nnLuz, nnH3H, At4CLI, AhSTS</i>
	ppas226	
	ppas227	
	ppas219	<i>nnLuz, nnH3H, At4CLI, CalPKS1</i>
	ppas220	
	ppas221	
	ppas336	<i>nnLuz, nnH3H, npgA, nnHispS</i>
	ppas337	

	ppas338	
	ppas671	<i>nnLuz, nnH3H, Pv4CL1</i>
	ppas012	<i>nnLuz, nnH3H, At4CL1</i>
	ppas000	<i>Wild type</i>
	ppas874	<i>npgA</i>
	ppas013	<i>At4CL1</i>
	ppas037	<i>npgA. nnHisps</i>
	ppas039	<i>At4CL1, AsPKS2</i>
	ppas040	<i>At4CL1, AtPKSA</i>
	ppas041	<i>At4CL1, PpASCL</i>
	ppas038	<i>At4CL1, HmS</i>
	ppas042	<i>At4CL1, PcPKS3</i>
	ppas043	<i>At4CL1, RpBAS_L132S</i>
	ppas1189	<i>At4CL1, PzPKS2</i>
	ppas044	<i>At4CL1, EaPKS2</i>
	ppas045	<i>At4CL1, PmSPS1</i>
	ppas046	<i>At4CL1, PmSPS2</i>
Стабильные линии <i>Nicotiana benthamiana</i>	NB034	<i>nnLuz, nnH3H, nnCPH</i>
	NB218	<i>nnLuz, nnH3H, nnCPH, PpASCL</i>
	NB220	
	NB221	

	NB2359	<i>nnLuz, nnH3H, nnCPH, nnHispS, npgA</i>
	NB021	<i>nnLuz, nnH3H, nnCPH, nnHispS</i>

**Таблица 5.** Праймеры для секвенирования, генотипирования и ПЦР в реальном времени, использованные в данной работе.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера
Corgl PKS part3 RT rev	ACCAAGACGCTCGGATGGCC
Corgl PKS part3 RT dir	GCTTACTCCCATAGCTGTTCAAGTCATCG
Corgl PKS part1 RT rev	GTACTGACTCTTGTGTGCCAACAACTTAC
Corgl PKS part1 RT dir	CCTCAGCCATTGATATGGACTACATTGC
Gymch PKS part3 RT rev	GCTATCCTACTACTATACTTTTCGATTACAAAAGCAATC
Gymch PKS part3 RT dir	GGATAGATTAGCTAAGAGTCATCAGGCTCG
Gymch PKS part1 RT rev	GCAAGATTCTGTGACTGAGGTTGCTTG
Gymch PKS part1 RT dir	CCTTCCTGTGTTAGAAGCCTGGCTAG
Hypsu PKS part3 RT rev	AGCGACTCCATAACTCTCTAACACGTTA
Hypsu PKS part3 RT dir	CTCAAATAGACTTGACAAAGCAGCAAGCA
Hypsu PKS part1 RT rev	CTCAAATAGACTTGACAAAGCAGCAAGCA
Hypsu PKS part1 RT dir	ATACTGGATAGCACACGCAAAGAGTCC
AsPKS1 dir	CACAAGCAGTACAACAAAATGT
AsPKS1 rev	GCATAAGCTTTCAAAGTGCCAAGTTACGGGCC
AsPKS2 dir	AAGGCCGATGGTGATCTTAAG
AsPKS2 rev	GCATAAGCTTTCAAAGTGAACGAAGCAGAATGCC

HmS dir	CATTGATTGGAACCTCTATCTTTT
HmS rev	GCATAAGCTTTCAAATGGGCACACTGTGCAACA
AtPKSA dir	GGCGACGAGTCCATGGAATT
AtPKSA rev	GCATAAGCTTTTCATGATGAAGTAAGACTACGGATC
PpASCL dir	ATAACGATATTTTCTGGGCAGT
PpASCL rev	GCATAAGCTTTTCAGCACAGGTTACGCAGCAAAG
PcPKS3 dir	ACTCTCTTTTTCTGGATCGCAC
PcPKS3 rev	GCATAAGCTTTTCAGTTAGCAACGGGAACAGAATG
RpBAS_L132S dir	CTCCCTTTTTTGGATCGCCC
RpBAS_L132S rev	GCATAAGCTTTCAAGAGATTACGGGTACTGAACG
RtSTS dir	CAGATTGGAACCTCTTGTTCTG
RtSTS rev	GAGCATtACTAGTTTAGTGATGGTGGTGGTGATGTGTGATCAGTGGCACGGAGGACAGG ACC
WtPKS1 dir	CTGATTGGAACCTCCATTTTTTG
WtPKS1 rev	GAGCATACTAGTTTAGTGATGGTGGTGGTGATGAATTGACAAGGGTACGGAATGCAGC ACC
EaPKS1 dir	CGCATTCATCATCAACTTGGG
EaPKS1 rev	GAGCATACTAGTTTAGTGATGGTGGTGGTGATGATCACGGTTGATTGCAAAATGATGCA GTTG
EaPKS2 dir	CTTCTGTGAATGACATCTTTTG
EaPKS2 rev	GAGCATACTAGTTTAGTGATGGTGGTGGTGATGGCAAGCCAAACGGATTGATTTAAGCA GCA
EaPKS3_mut dir	CTTCCTATAATGATGTGTTTTGG
EaPKS3_mut rev	gcatAAGCTTtcaGTTGCAAAGATTGACAGACTTA

EaPKS3 dir	CATCCTATAATGACGTCTTTTGG
EaPKS3 rev	GAGCATACTAGTTTAGTGATGGTGGTGGTGGTGGTTACAAAGGTTACAGATTTAAGCA GGATAGTCTCC
PmSPS1 dir	CTCACCCCGGCGGCCC
PmSPS1 rev	GCATAAGCTTTCAAGACTTACCTGACCTTCC
PmSPS2 dir	AATAGCATATTCTGGACTGCTCA
PmSPS2 rev	GCATAAGCTTTCAGGACTTACCTGAATTGGC
PzPKS2 dir	GAAGTCTTTGGAGAACGGTC
PzPKS2 rev	gaGTTTACAACAGGGACACTG
AhSTS dir	GATTTGATGAGGAAGagaTCTC
AhSTS rev	gaTATGGCCACACTTCTAAGA
CalPKS1 dir	TGAGGAGGAAATCAACAAAAGA
CalPKS1 rev	gaAATAGCAATACTGTGCAACA
OsPKS dir	GAGGCAGAGGAAGGAGGC
OsPKS rev	gaATTACATGAGAGGTGGC
PcPKS2 dir	GAGGTCACTTGAGAATGGTC
PcPKS2 rev	gaGTGTATAATAGGAACACTAC
NtPKS1 dir	GAGTACATGCGTGAAGAA
NtPKS1 rev	gaGAGGTTTCTCTCCAACAAT
Pich actin dir	GGTGTGGTGCCAGATCTTTT
Pich actin rev	AGTGTTCCCATCGGTCGTAG
At4CL1 dir	GATGTTGCTGTCGTTGCAATG



At4CL1 rev	tctcGAAGACAACAGAACCTGCGTAATCAGGTACGTCATA
Pv4CL1 dir	GTTGCTAAAGAAGTTGTATTCTAT
Pv4CL1 rev	gaATGTACCCCTGCGGCAA
nnH3H dir	GGTTTTGGTATGGGCCTG
nnH3H rev	agtcAAGCTTTCAGGCAGAATTAGAACTTCTTAG
nnLuz dir	ATCCCTAGCCACGACACTGT
nnLuz rev	gcatAAGCTTTCACCTTGGCGTTTTCTACAATC

**Таблица 6.** Плазмиды, использованные в данной работе.

ID плазмиды	Название плазмиды	Карта генетической конструкции
Для экспериментов на <i>Pichia pastoris</i>		
pNK4435	pGap - cgPKS WT - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-NL74aiWHvMC5adIV2WBJ?m=slm-LKepp7cJJCXDzAbZeOLd">https://benchling.com/s/seq-NL74aiWHvMC5adIV2WBJ?m=slm-LKepp7cJJCXDzAbZeOLd</a>
pNK4710	pGap - gcPKS WT - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-7nGLItIAJ8Jr9YHjYHQ?m=slm-Ob2AQmWP4DRb3Ntw94gw">https://benchling.com/s/seq-7nGLItIAJ8Jr9YHjYHQ?m=slm-Ob2AQmWP4DRb3Ntw94gw</a>
pNK4646	pGap - hsPKS WT - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-TuIZsuldl7K6YngJaYuD?m=slm-a5tTbM9ovSZijyEWniok">https://benchling.com/s/seq-TuIZsuldl7K6YngJaYuD?m=slm-a5tTbM9ovSZijyEWniok</a>
pNK4437	pGap - cgPKS 2Δ - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-2Xy6qcfAQIC238Gr5zik?m=slm-dBp4hZtBkcI8sP0PmBh4">https://benchling.com/s/seq-2Xy6qcfAQIC238Gr5zik?m=slm-dBp4hZtBkcI8sP0PmBh4</a>
pNK4669	pGap - gcPKS 2Δ - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-AJQ6tf8cLnIBI7LLfSxz?m=slm-Lso4BL3LSXYGJc5dBgjc">https://benchling.com/s/seq-AJQ6tf8cLnIBI7LLfSxz?m=slm-Lso4BL3LSXYGJc5dBgjc</a>
pNK4665	pGap - hsPKS 2Δ - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-VuK85cbYVnyyRDPTYcDL?m=slm-ANyLyYfQN5IF16ONhSug">https://benchling.com/s/seq-VuK85cbYVnyyRDPTYcDL?m=slm-ANyLyYfQN5IF16ONhSug</a>
pNK4513	pGap - cgPKS 2Δ_C - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-GXfE3gr5gw6vrrWNYuNR?m=slm-TYK6HitbPNr1oF9NFA6d">https://benchling.com/s/seq-GXfE3gr5gw6vrrWNYuNR?m=slm-TYK6HitbPNr1oF9NFA6d</a>
pNK4667	pGap - gcPKS 2Δ_C - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-SSvx2tXEY5ISxuzdAZMs?m=slm-xGGaFcgexSOKZV5rTyHF">https://benchling.com/s/seq-SSvx2tXEY5ISxuzdAZMs?m=slm-xGGaFcgexSOKZV5rTyHF</a>
pNK4650	pGap - hsPKS 2Δ_C - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-AJsT8MAio0kicPRlBzmG?m=slm-OKsy3dH7HKUj1SIlc7uv">https://benchling.com/s/seq-AJsT8MAio0kicPRlBzmG?m=slm-OKsy3dH7HKUj1SIlc7uv</a>

pNK3404	pGap - At4CL1 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-m6wrTzqsj8zicKydDerL?m=slm-kEEqCQBzIUDKwAHkHWJi">https://benchling.com/s/seq-m6wrTzqsj8zicKydDerL?m=slm-kEEqCQBzIUDKwAHkHWJi</a>
pNK3402	pGap - Pv4CL1 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-BYgl0xhY33kzIUK3ApIq?m=slm-chCt1JYHTwyNICAaMHh5">https://benchling.com/s/seq-BYgl0xhY33kzIUK3ApIq?m=slm-chCt1JYHTwyNICAaMHh5</a>
pN001	pGap - AsPKS1 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-TsxNcYba7SEi1IvCwYyN?m=slm-yv1WXh3PHTII3EyTA1Tw">https://benchling.com/s/seq-TsxNcYba7SEi1IvCwYyN?m=slm-yv1WXh3PHTII3EyTA1Tw</a>
pN002	pGap - AsPKS2 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-zx9ZAdB4jbGpDWovpN0n?m=slm-qpxRsZIYwAsMfv2l9jSL">https://benchling.com/s/seq-zx9ZAdB4jbGpDWovpN0n?m=slm-qpxRsZIYwAsMfv2l9jSL</a>
pN003	pGap - HmS - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-pRRA8dmIaabhDHnPN1WS?m=slm-O3oCr0M0hIOAnzqoS4r">https://benchling.com/s/seq-pRRA8dmIaabhDHnPN1WS?m=slm-O3oCr0M0hIOAnzqoS4r</a>
pN004	pGap - AtPKSA - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-zlc88ZAIEk6SHGJPfaDr?m=slm-KJqrDES0hBpC6TIyzCRo">https://benchling.com/s/seq-zlc88ZAIEk6SHGJPfaDr?m=slm-KJqrDES0hBpC6TIyzCRo</a>
pN005	pGap - PpASCL - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-MLvwHwRKsBSIIP90XvEZ?m=slm-Z1n1QSOHuWY3IVtgZBZBG">https://benchling.com/s/seq-MLvwHwRKsBSIIP90XvEZ?m=slm-Z1n1QSOHuWY3IVtgZBZBG</a>
pN006	pGap - PcPKS3 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-NDrkX1QvTENBsJW7go6X?m=slm-Suy8Uy0AtajIeJIB0r9">https://benchling.com/s/seq-NDrkX1QvTENBsJW7go6X?m=slm-Suy8Uy0AtajIeJIB0r9</a>
pN007	pGap - RpBAS_L132S - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-FUwEy2PEamAta77dt5xl?m=slm-w929JBhDF4gdCIYLwt6y">https://benchling.com/s/seq-FUwEy2PEamAta77dt5xl?m=slm-w929JBhDF4gdCIYLwt6y</a>
pN008	pGap - RtSTS - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-uardiVguqYpZxkQINsam?m=slm-MLObZ8hzbySVaDTIRA6q">https://benchling.com/s/seq-uardiVguqYpZxkQINsam?m=slm-MLObZ8hzbySVaDTIRA6q</a>
pN009	pGap - WtPKS1 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-SIFIMm1e2SjaVETyHvYp?m=slm-59ZY3zKKtkBoUkkIH48E">https://benchling.com/s/seq-SIFIMm1e2SjaVETyHvYp?m=slm-59ZY3zKKtkBoUkkIH48E</a>
pN010	pGap - EaPKS1 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-P9oSA9tyjA1GFCYmXJYL?m=slm-yYQD09QcpYjf8tCdfJet">https://benchling.com/s/seq-P9oSA9tyjA1GFCYmXJYL?m=slm-yYQD09QcpYjf8tCdfJet</a>
pN011	pGap - EaPKS2 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-cQvR138dBQUGxmegovUz?m=slm-PR8x4teEVfn2rLrZPNF3">https://benchling.com/s/seq-cQvR138dBQUGxmegovUz?m=slm-PR8x4teEVfn2rLrZPNF3</a>
pN012	pGap - EaPKS3_mut - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-lpZILPktjP0bil3bQ09O?m=slm-DfovDlMqTehOwdCJnIMc">https://benchling.com/s/seq-lpZILPktjP0bil3bQ09O?m=slm-DfovDlMqTehOwdCJnIMc</a>
pN013	pGap - EaPKS3 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-vu7zDvGCUK8EJ4jFqEZj?m=slm-8lgeGZ6EtD4yJiM4jfdn">https://benchling.com/s/seq-vu7zDvGCUK8EJ4jFqEZj?m=slm-8lgeGZ6EtD4yJiM4jfdn</a>
pNK5972	pGap - PmSPS1 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-zPCE2sV7UVfIaeDXfGbZ?m=slm-K9dto17gVUI3OJY5ZGfC">https://benchling.com/s/seq-zPCE2sV7UVfIaeDXfGbZ?m=slm-K9dto17gVUI3OJY5ZGfC</a>
pNK5973	pGap - PmSPS2 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-Bpkz40lEPrcfMfK555IA?m=slm-iwJTmy5yGbDvtt6cdEtT">https://benchling.com/s/seq-Bpkz40lEPrcfMfK555IA?m=slm-iwJTmy5yGbDvtt6cdEtT</a>
pNK1337	pGap - PzPKS2 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-y4oyvfN7oOYe8U7AZRxt?m=slm-Q">https://benchling.com/s/seq-y4oyvfN7oOYe8U7AZRxt?m=slm-Q</a>

		NrmFzKmk3FdsvA9h8Jm
pNK1241	pGap - PcPKS2 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-6rPjiT2AboVEBfMeREpS?m=slm-C3IvbXq54hGJiHeP3cbO">https://benchling.com/s/seq-6rPjiT2AboVEBfMeREpS?m=slm-C3IvbXq54hGJiHeP3cbO</a>
pNK1228	pGap - OsPKS - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-gAaLZaRSNyR82RMXE9Q4?m=slm-1wsIFKFM7eoQZ08v0Rsr">https://benchling.com/s/seq-gAaLZaRSNyR82RMXE9Q4?m=slm-1wsIFKFM7eoQZ08v0Rsr</a>
pNK1338	pGap - NtPKS1 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-AT1g8uRsEwgascKC25AIH?m=slm-lAKwWHNbS4AwTBfiDwHa">https://benchling.com/s/seq-AT1g8uRsEwgascKC25AIH?m=slm-lAKwWHNbS4AwTBfiDwHa</a>
pNK1246	pGap - AhSTS - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-EkHBqsN4BWB8Vv1ZpsV3?m=slm-CIOAhjdmGqMahF9tVrSD">https://benchling.com/s/seq-EkHBqsN4BWB8Vv1ZpsV3?m=slm-CIOAhjdmGqMahF9tVrSD</a>
pNK1227	pGap - CalPKS1 - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-bHxKSdFnDwWasqJ5rUn?m=slm-SALULca5FKIBrHmIG74L">https://benchling.com/s/seq-bHxKSdFnDwWasqJ5rUn?m=slm-SALULca5FKIBrHmIG74L</a>
pNK1507	pGap - nnHisps - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-QgA0nrEXqO4Cb9HIcoyb?m=slm-tWHZ2NoP6JFmuVz2SuTv">https://benchling.com/s/seq-QgA0nrEXqO4Cb9HIcoyb?m=slm-tWHZ2NoP6JFmuVz2SuTv</a>
pNK1637	pGap - npgA - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-SWbHhDP60E0U1rULTq78?m=slm-oRXLoRIXCoNT7PaOGILV">https://benchling.com/s/seq-SWbHhDP60E0U1rULTq78?m=slm-oRXLoRIXCoNT7PaOGILV</a>
pNK6701	pGap - FFluc - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-u8dbhWgpXTKi154SbxEl?m=slm-oKzc0RbC3EMDifoz3xgT">https://benchling.com/s/seq-u8dbhWgpXTKi154SbxEl?m=slm-oKzc0RbC3EMDifoz3xgT</a>
pNK6766	pGap - Nanoluc - tAOX	<a href="https://benchling.com/s/seq-MhVWrZpXt6HumM6YITEx?m=slm-y8xtkXWIIKn8SBIYdDNI">https://benchling.com/s/seq-MhVWrZpXt6HumM6YITEx?m=slm-y8xtkXWIIKn8SBIYdDNI</a>
Для экспериментов на растениях		
pNK062	L1-1   pNOS - P19 - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-RYyvplUDlaBIZVyGhuxm?m=slm-eJgj3Gh7HJZV7f3othYM">https://benchling.com/s/seq-RYyvplUDlaBIZVyGhuxm?m=slm-eJgj3Gh7HJZV7f3othYM</a>
pNK093	L1-4   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega - nnLuz - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-Ddvv5VZIYUM7Cv3GFBQp?m=slm-RqgtHGaw5xQi7uSfTtUr">https://benchling.com/s/seq-Ddvv5VZIYUM7Cv3GFBQp?m=slm-RqgtHGaw5xQi7uSfTtUr</a>
pX030	L1-5   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega - CPH - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-pH45GUiQ6iwRHJebnzY0?m=slm-tw8bt88Z4BPTnGNZ8Wq9">https://benchling.com/s/seq-pH45GUiQ6iwRHJebnzY0?m=slm-tw8bt88Z4BPTnGNZ8Wq9</a>
pNK093	L1-6   pFMV - nnH3H - tNOS	<a href="https://benchling.com/s/seq-UcmQVvyYAqPOIykpade?m=slm-A14cAcGZy3Hk8XHKkER0">https://benchling.com/s/seq-UcmQVvyYAqPOIykpade?m=slm-A14cAcGZy3Hk8XHKkER0</a>
pNK069	L1-3   pCmYLCV - At4CL1 - tATP	<a href="https://benchling.com/s/seq-SWdlqrsb34LhecB56Fgb?m=slm-jnr9GHCvadY1FtFloQ2T">https://benchling.com/s/seq-SWdlqrsb34LhecB56Fgb?m=slm-jnr9GHCvadY1FtFloQ2T</a>
pNK276	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-AsPKS1 - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-sYhLTULbprTUEoOEbLxL?m=slm-L4w5Hs0yUoMPpyXcEQsI">https://benchling.com/s/seq-sYhLTULbprTUEoOEbLxL?m=slm-L4w5Hs0yUoMPpyXcEQsI</a>

pNK277	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-AsPKS2 - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-YVQLBHvYarVnQRluLpB8?m=slm-SOHwz7PrG6BTuHqfmQLk">https://benchling.com/s/seq-YVQLBHvYarVnQRluLpB8?m=slm-SOHwz7PrG6BTuHqfmQLk</a>
pKB147	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega- HmS - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-hWUU2sN20C0OzEeybNE8?m=slm-KOlvhPAyhoLxoXN4sp0U">https://benchling.com/s/seq-hWUU2sN20C0OzEeybNE8?m=slm-KOlvhPAyhoLxoXN4sp0U</a>
pNK306	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-AtPKSA - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-chCq17w2zPd90xsgwOMM?m=slm-LM6ZpjjOhYF92Lp9QDBb">https://benchling.com/s/seq-chCq17w2zPd90xsgwOMM?m=slm-LM6ZpjjOhYF92Lp9QDBb</a>
pNK657	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-PpASCL - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-0BydnO38KrevKMyhhWx1?m=slm-VxQxfLFLzFdVX1C1ZVx6">https://benchling.com/s/seq-0BydnO38KrevKMyhhWx1?m=slm-VxQxfLFLzFdVX1C1ZVx6</a>
pKB148	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-PcPKS3 - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-0zUAAWXO4X4UCIxACwl4?m=slm-OMdSQdC8gmBBUTa3sNh4">https://benchling.com/s/seq-0zUAAWXO4X4UCIxACwl4?m=slm-OMdSQdC8gmBBUTa3sNh4</a>
pNK282	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-RpBAS_L132S - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-bBw141tDvlZoQUHlJaYe?m=slm-vQeXMloHVDFUdAVjrWmZ">https://benchling.com/s/seq-bBw141tDvlZoQUHlJaYe?m=slm-vQeXMloHVDFUdAVjrWmZ</a>
pKB149	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-EaPKS2 - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-5rRjb76gP4MN9Y0IoHZQ?m=slm-Cb3Vba1hKynV1F8P7EaM">https://benchling.com/s/seq-5rRjb76gP4MN9Y0IoHZQ?m=slm-Cb3Vba1hKynV1F8P7EaM</a>
pNK891	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-CalPKS1 - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-qjhQRQgDVQUTnjp7xByM?m=slm-dODMfjOT200xc2bFX7B9">https://benchling.com/s/seq-qjhQRQgDVQUTnjp7xByM?m=slm-dODMfjOT200xc2bFX7B9</a>
pNK625	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-NtPKS1 - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-43OWdLnujKNA4q7prx1f?m=slm-kELSBFK5eaVDLhRVNDm8">https://benchling.com/s/seq-43OWdLnujKNA4q7prx1f?m=slm-kELSBFK5eaVDLhRVNDm8</a>
pNK624	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-AhSTS - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-TwFubLjEBYmigJEJm7id?m=slm-WURymbBN4nOHeb6SQBy4">https://benchling.com/s/seq-TwFubLjEBYmigJEJm7id?m=slm-WURymbBN4nOHeb6SQBy4</a>
pNK1028	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-PzPKS2 - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-iTVNB6gU30Kvnj6HHX5s?m=slm-JcnST5wL40IAnlrGuKqu">https://benchling.com/s/seq-iTVNB6gU30Kvnj6HHX5s?m=slm-JcnST5wL40IAnlrGuKqu</a>
pNK622	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-PcPKS2 - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-ghOucIV8b42KGgx1WrO5?m=slm-W12DK4xgWQnpPLOM8S1s">https://benchling.com/s/seq-ghOucIV8b42KGgx1WrO5?m=slm-W12DK4xgWQnpPLOM8S1s</a>
pNK474	LM-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-PpASCL - tOCS   pNOS - HygrR - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-Jl36TWwgEaGIX11NsfML?m=slm-lkYCNnY2Csc0jK3jUXqu">https://benchling.com/s/seq-Jl36TWwgEaGIX11NsfML?m=slm-lkYCNnY2Csc0jK3jUXqu</a>

pAB038	pNOS - KanR - tOCS   p35s_1.3kb - 5'UTR TMV omega - nnCPH - tOCS  p35s_1.3kb - 5'UTR TMV omega - nnH3H - tOCS   p35s_1.3kb - 5'UTR TMV omega - nnLuz - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-6LfsmE2SvBd6fV55z2ux?m=slm-aMiRutUL0rBm4zqr3xIF">https://benchling.com/s/seq-6LfsmE2SvBd6fV55z2ux?m=slm-aMiRutUL0rBm4zqr3xIF</a>
pX028	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega - nnHisps - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-RZSqngarVOTfY6YkQwbi?m=slm-nDRWeULaMf3D0lv55JQm">https://benchling.com/s/seq-RZSqngarVOTfY6YkQwbi?m=slm-nDRWeULaMf3D0lv55JQm</a>
pNK077	L1-3   pCmYLCV - npgA - tATP	<a href="https://benchling.com/s/seq-KnaQNbefkXDrg8iLcMkn?m=slm-pNyGIuy4jFiIDFOd0an7">https://benchling.com/s/seq-KnaQNbefkXDrg8iLcMkn?m=slm-pNyGIuy4jFiIDFOd0an7</a>
pNK5744	LM-4   p35s_1.4kb - nnLuz - tAct2   p35s_0.4kb - nnCPH - tOCS   pFMV - nnH3H - tNOS	<a href="https://benchling.com/s/seq-b4yEQjLZVRcBD0n9xl?m=slm-FbK7bF66bkikMVpbZHQR">https://benchling.com/s/seq-b4yEQjLZVRcBD0n9xl?m=slm-FbK7bF66bkikMVpbZHQR</a>
pNK328	LM-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega - nnHisps - tOCS   pCmYLCV - npgA - tATP	<a href="https://benchling.com/s/seq-dSatuz4vY5VHAhQ6SHy6?m=slm-O2kdYoG6fjtgSHdNC9ja">https://benchling.com/s/seq-dSatuz4vY5VHAhQ6SHy6?m=slm-O2kdYoG6fjtgSHdNC9ja</a>
pNK6260	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-FFLuc- tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-p9DhYLhq19tb7w0WByGJ?m=slm-aJDvpOuOCnqmlYZoirfh">https://benchling.com/s/seq-p9DhYLhq19tb7w0WByGJ?m=slm-aJDvpOuOCnqmlYZoirfh</a>
pNK6269	L1-2   p35s_0.4kb - 5'UTR TMV omega-nanoluc - tOCS	<a href="https://benchling.com/s/seq-q8457Sl7OXMulQ5JB0BV?m=slm-CkGvdi7lMlnoz7VrsZgp">https://benchling.com/s/seq-q8457Sl7OXMulQ5JB0BV?m=slm-CkGvdi7lMlnoz7VrsZgp</a>
Для экспериментов на клетках млекопитающих		
pN021	pCMV - nnLuz - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-Z37IB4oDW0iVBjzLEFnn?m=slm-9Mco8HsoEpDGdl3vnkUe">https://benchling.com/s/seq-Z37IB4oDW0iVBjzLEFnn?m=slm-9Mco8HsoEpDGdl3vnkUe</a>
pN022	pCMV - nnH3H - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-X0HAsClIT6dIOOgyJFLS?m=slm-t2rEiH1c649ABY3yabRk">https://benchling.com/s/seq-X0HAsClIT6dIOOgyJFLS?m=slm-t2rEiH1c649ABY3yabRk</a>
pX158	pCMV - At4CL1 - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-RVUuDnc3Bdpht6YCuiTN?m=slm-t4n6vYXyL4Pquq7LAoQU">https://benchling.com/s/seq-RVUuDnc3Bdpht6YCuiTN?m=slm-t4n6vYXyL4Pquq7LAoQU</a>
pNK2917	pEF1 $\alpha$ - At4CL1 - 3'UTR_BGH	<a href="https://benchling.com/s/seq-OzOADh5AMM74WKNjmBqF?m=slm-vkoNMm5i2jJDZeOfZAJq">https://benchling.com/s/seq-OzOADh5AMM74WKNjmBqF?m=slm-vkoNMm5i2jJDZeOfZAJq</a>
pNK2907	pEF1 $\alpha$ - At4CL2 - 3'UTR_BGH	<a href="https://benchling.com/s/seq-J2kRS7oGIT8gClbL4cga?m=slm-R8cBGpxzVMwgESc6Erbo">https://benchling.com/s/seq-J2kRS7oGIT8gClbL4cga?m=slm-R8cBGpxzVMwgESc6Erbo</a>

pNK2915	pEF1 $\alpha$ - Nt4CL2 - 3'UTR_BGH	<a href="https://benchling.com/s/seq-D4bBEu7g8U4S0K2YXuCN?m=slm-bUZOJajPRdx188KBfew8">https://benchling.com/s/seq-D4bBEu7g8U4S0K2YXuCN?m=slm-bUZOJajPRdx188KBfew8</a>
pNK2913	pEF1 $\alpha$ - Pv4CL1 - 3'UTR_BGH	<a href="https://benchling.com/s/seq-NyTHD4b0PNQfnjM6HIOT?m=slm-gqXPdvGLXmQgeEJAgOIA">https://benchling.com/s/seq-NyTHD4b0PNQfnjM6HIOT?m=slm-gqXPdvGLXmQgeEJAgOIA</a>
pX137	pCMV - npgA - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-RpulkKBJIWumFQqDyIqa?m=slm-aHyh7E5aGQEbnmpn4Xqn">https://benchling.com/s/seq-RpulkKBJIWumFQqDyIqa?m=slm-aHyh7E5aGQEbnmpn4Xqn</a>
pNK4292	pCMV - PzPKS2 - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-DiDfruPE08ATt8MYEJnt?m=slm-7p87KPAflrH9ACBVVrOc">https://benchling.com/s/seq-DiDfruPE08ATt8MYEJnt?m=slm-7p87KPAflrH9ACBVVrOc</a>
pX156	pCMV - HmS - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-BSJCIJauIWx6JOhtyi1B?m=slm-fMb3XJF7YgSMKsD3hEIg">https://benchling.com/s/seq-BSJCIJauIWx6JOhtyi1B?m=slm-fMb3XJF7YgSMKsD3hEIg</a>
pX157	pCMV - AtPKSA - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-1vZYXt4Zt7uY24igBHR2?m=slm-VdrwYJkjQ8MGHRLJcnvs">https://benchling.com/s/seq-1vZYXt4Zt7uY24igBHR2?m=slm-VdrwYJkjQ8MGHRLJcnvs</a>
pNK2896	pCMV - CalPKS1 - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-4lm66JuyEdzjcod81unT?m=slm-fzcQ4MxDpidtCrhKyb1j">https://benchling.com/s/seq-4lm66JuyEdzjcod81unT?m=slm-fzcQ4MxDpidtCrhKyb1j</a>
pNK2898	pCMV - AhSTS - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-WvvT5kFWJ3ZiUSyqZWfU?m=slm-0Gyg8H7nDjvZNS8ZwyVC">https://benchling.com/s/seq-WvvT5kFWJ3ZiUSyqZWfU?m=slm-0Gyg8H7nDjvZNS8ZwyVC</a>
pNK2901	pCMV - PcPKS3 - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-uHhtFw8dw1xlzgpVvUdj?m=slm-23vt29c00QOgGKjrJs3i">https://benchling.com/s/seq-uHhtFw8dw1xlzgpVvUdj?m=slm-23vt29c00QOgGKjrJs3i</a>
pNK2905	pCMV - NtPKS1 - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-BE3Us73tN5rA7yzwIUen?m=slm-Bq1N4qYma4peclVLt53D">https://benchling.com/s/seq-BE3Us73tN5rA7yzwIUen?m=slm-Bq1N4qYma4peclVLt53D</a>
pNK6037	pCMV - PpASCL - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-FEteabmI0kaeMIME65hk?m=slm-DQLGVY3YoAU9IYDmjyQN">https://benchling.com/s/seq-FEteabmI0kaeMIME65hk?m=slm-DQLGVY3YoAU9IYDmjyQN</a>
pNK6039	pCMV - RpBAS_L132S - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-qYMxKnAQlbnEyENUAOTO?m=slm-xgoXXhjUjzccoeJfsJl1">https://benchling.com/s/seq-qYMxKnAQlbnEyENUAOTO?m=slm-xgoXXhjUjzccoeJfsJl1</a>
pNK6038	pCMV - PcPKS2 - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-k0Bg3wdPzL7r2EKNiCYP?m=slm-QktgV9zxnnvaX55Mlaiu">https://benchling.com/s/seq-k0Bg3wdPzL7r2EKNiCYP?m=slm-QktgV9zxnnvaX55Mlaiu</a>
pX135	pCMV - nnHisps - 3'UTR_SV40	<a href="https://benchling.com/s/seq-nl1eb986Zxk0sZGVEMDt?m=slm-gm1MFkhaitfObtxbcDca">https://benchling.com/s/seq-nl1eb986Zxk0sZGVEMDt?m=slm-gm1MFkhaitfObtxbcDca</a>

## Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, Александру Сергеевичу Мишину, и заведующему Отделом биомолекулярной химии, Илье Викторовичу Ямпольскому, за предоставленную возможность получить уникальный опыт научной работы в вашей лаборатории. Спасибо за неоценимую помощь на протяжении всех этих лет, мудрые советы и конструктивную критику.

Особую благодарность автор выражает коллегам, без которых данная работа не могла бы состояться: Карену Саркисяну, Надежде Мышкиной, Екатерине Шаховой, Анастасии Балакиревой, Максиму Перфилову, Ольге Белозеровой, Анне Алекберовой, Алёне Малышевской, Евгении Бугаевой, Галине Делновой, Никите Сытову, Татьяне Митюшкиной, Татьяне Каратаевой, Лилии Фахрануровой, Татьяне Чепурных, Андрею Гороховатскому, Алексею Котлобаю, Дмитрию Горбачеву и другим сотрудникам лаборатории, кто помогал с постановкой экспериментов, обсуждением результатов и написанием текстов статей.

Автор выражает благодарность группе профессора Диего Орзаеса из Политехнического Университета Валенсии (Universitat Politècnica de València) за предоставленную ценную возможность обмена опытом и совместного проведения исследований.

Автор благодарит своих оппонентов: доктора биологических наук Дмитрия Александровича Грядунова; доктора биологических наук Владимира Израилевича Муронца и представителя ведущей организации: доктора биологических наук, члена-корреспондента РАН Сулеймана Ифхан-оглы Аллахвердиева.

Наконец, огромную признательность автор выражает своей семье и близким за их поддержку и помощь на протяжении всего этого пути.

## Список литературы

1. Abdel-Mawgoud A. M. и др. Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica* //Metabolic engineering. – 2018. – Т. 50. – С. 192-208.
2. Abe I. и др. Benzalacetone synthase: a novel polyketide synthase that plays a crucial role in the biosynthesis of phenylbutanones in *Rheum palmatum* //European Journal of Biochemistry. – 2001. – Т. 268. – №. 11. – С. 3354-3359.
3. Abramson J. и др. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 //Nature. – 2024. – С. 1-3.
4. Akiyama T. и др. p-Coumaroyltriatic acid synthase, a new homologue of chalcone synthase, from *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* //European journal of biochemistry. – 1999. – Т. 263. – №. 3. – С. 834-839.
5. Al-Feel W., DeMar J. C., Wakil S. J. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain defective in acetyl-CoA carboxylase arrests at the G2/M phase of the cell cycle //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – Т. 100. – №. 6. – С. 3095-3100.
6. Arentshorst M. и др. Utilization of ferulic acid in *Aspergillus niger* requires the transcription factor FarA and a newly identified Far-like protein (FarD) that lacks the canonical Zn (II) 2Cys6 domain //Frontiers in Fungal Biology. – 2022. – Т. 3. – С. 978845.
7. Austin M. B. и др. An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases //Chemistry & biology. – 2004. – Т. 11. – №. 9. – С. 1179-1194.
8. Austin M. B., Noel J. P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases //Natural product reports. – 2003. – Т. 20. – №. 1. – С. 79-110.
9. Austin M. B. и др. Biosynthesis of *Dictyostelium discoideum* differentiation-inducing factor by a hybrid type I fatty acid–type III polyketide synthase //Nature chemical biology. – 2006. – Т. 2. – №. 9. – С. 494-502.
10. Bai X. и др. Polyketides as secondary metabolites from the genus *Aspergillus* //Journal of Fungi. – 2023. – Т. 9. – №. 2. – С. 261.
11. Becker J. и др. From zero to hero—design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for l-lysine production //Metabolic engineering. – 2011. – Т. 13. – №. 2. – С. 159-168.
12. Beckert C. и др. Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense* //Phytochemistry. – 1997. – Т. 44. – №. 2. – С. 275-283.
13. Belcher M. S., Mahinthakumar J., Keasling J. D. New frontiers: harnessing pivotal advances in microbial engineering for the biosynthesis of plant-derived terpenoids //Current opinion in biotechnology. – 2020. – Т. 65. – С. 88-93.
14. Beld J. и др. The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life //Natural product reports. – 2014. – Т. 31. – №. 1. – С. 61-108.
15. Bennett L. и др. Heat-stable components of wood ear mushroom, *Auricularia polytricha* (higher Basidiomycetes), inhibit in vitro activity of beta secretase (BACE1) //International journal of medicinal mushrooms. – 2013. – Т. 15. – №. 3.
16. Bentley R. Biochemistry of fungi //Annual review of biochemistry. – 1962. – Т. 31. – №. 1. – С. 589-624.
17. Tu P. T. B., Chompoo J., Tawata S. Hispidin and related herbal compounds from *Alpinia zerumbet* inhibit both PAK1-dependent melanogenesis in melanocytes and reactive oxygen species (ROS) production in adipocytes //Drug Discoveries &



- Therapeutics. – 2015. – Т. 9. – №. 3. – С. 197-204.
18. Birch A. J. Biosynthesis of polyketides and related compounds //Science. – 1967. – Т. 156. – №. 3772. – С. 202-206.
  19. Birch A. J., Donovan F. W. Studies in relation to biosynthesis. I. Some possible routes to derivatives of orcinol and phloroglucinol //Australian Journal of Chemistry. – 1953. – Т. 6. – №. 4. – С. 360-368.
  20. 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.
  21. Blin K. и др. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline //Nucleic acids research. – 2019. – Т. 47. – №. W1. – С. W81-W87.
  22. Brachmann A. O. и др. A type II polyketide synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens* //ChemBioChem. – 2007. – Т. 8. – №. 14. – С. 1721-1728.
  23. Brandizzi F. и др. BY-2 cells: culture and transformation for live cell imaging //Current protocols in cell biology. – 2003. – Т. 19. – №. 1. – С. 1.7. 1-1.7. 16.
  24. Brand S. и др. A type III polyketide synthase from *Wachendorfia thyrsiflora* and its role in diarylheptanoid and phenylphenalenone biosynthesis //Planta. – 2006. – Т. 224. – С. 413-428.
  25. Butelli E. и др. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors //Nature biotechnology. – 2008. – Т. 26. – №. 11. – С. 1301-1308.
  26. 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.
  27. 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.
  28. Cheng Z. и др. Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glucose via malonyl-CoA pathway by engineered *Escherichia coli* //Bioresource technology. – 2016. – Т. 200. – С. 897-904.
  29. Chen Q., Lai H. Gene delivery into plant cells for recombinant protein production //BioMed research international. – 2015. – Т. 2015. – №. 1. – С. 932161.
  30. Chen Y. и др. Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism //Metabolic engineering. – 2013. – Т. 15. – С. 48-54.
  31. 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.
  32. Chooi Y. H., Tang Y. Navigating the fungal polyketide chemical space: from genes to molecules //The Journal of organic chemistry. – 2012. – Т. 77. – №. 22. – С. 9933-9953.
  33. Colpitts C. C. и др. PpASCL, a moss ortholog of anther-specific chalcone synthase-like enzymes, is a hydroxyalkylpyrone synthase involved in an evolutionarily conserved sporopollenin biosynthesis pathway //New Phytologist. – 2011. – Т. 192. – №. 4. – С. 855-868.
  34. Costa M. A. и др. Characterization in vitro and in vivo of the putative multigene 4-coumarate: CoA ligase network in *Arabidopsis*: syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation //Phytochemistry. – 2005. – Т. 66. – №. 17. – С. 2072-2091.
  35. Cox R. J. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines

- begin to reveal their secrets //Organic & biomolecular chemistry. – 2007. – T. 5. – №. 13. – C. 2010-2026.
36. Cox R. J., Evitt A. S. Acyl palladium species in synthesis: single-step synthesis of, -unsaturated ketones from acid chlorides Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental procedures, data for all synthetic compounds, and crystal structure data for compound 22. See. – 2007.
  37. Cramer P. AlphaFold2 and the future of structural biology //Nature structural & molecular biology. – 2021. – T. 28. – №. 9. – C. 704-705.
  38. Cravens A., Payne J., Smolke C. D. Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products //Nature communications. – 2019. – T. 10. – №. 1. – C. 2142.
  39. Cronan J. E., Thomas J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways //Methods in enzymology. – 2009. – T. 459. – C. 395-433.
  40. Dao T. T. H., Linthorst H. J. M., Verpoorte R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance //Phytochemistry Reviews. – 2011. – T. 10. – C. 397-412.
  41. Davis M. S., Cronan Jr J. E. Inhibition of Escherichia coli acetyl coenzyme A carboxylase by acyl-acyl carrier protein //Journal of bacteriology. – 2001. – T. 183. – №. 4. – C. 1499-1503.
  42. De Schutter K. и др. Genome sequence of the recombinant protein production host Pichia pastoris //Nature biotechnology. – 2009. – T. 27. – №. 6. – C. 561-566.
  43. Dong J. Y., Fan P. D., Frizzell R. A. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus //Human gene therapy. – 1996. – T. 7. – №. 17. – C. 2101-2112.
  44. Dong N. Q., Lin H. X. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant–environment interactions //Journal of integrative plant biology. – 2021. – T. 63. – №. 1. – C. 180-209.
  45. Du Y. и др. Engineering Saccharomyces cerevisiae coculture platform for the production of flavonoids //Journal of agricultural and food chemistry. – 2020. – T. 68. – №. 7. – C. 2146-2154.
  46. Edwards R. L., Lewis D. G., Wilson D. V. 983. Constituents of the higher fungi. Part I. Hispidin, a new 4-hydroxy-6-styryl-2-pyrone from polyporus hispidus (Bull.) Fr //Journal of the Chemical Society (Resumed). – 1961. – C. 4995-5002.
  47. Edwards R. L., Wilson D. V. 984. Constituents of the higher fungi. Part II. The synthesis of hispidin //Journal of the Chemical Society (Resumed). – 1961. – C. 5003-5004.
  48. El-Seedi H. R. и др. Hydroxycinnamic acids: Natural sources, biosynthesis, possible biological activities, and roles in Islamic medicine //Studies in natural products chemistry. – 2018. – T. 55. – C. 269-292.
  49. Engler C. и др. A golden gate modular cloning toolbox for plants //ACS synthetic biology. – 2014. – T. 3. – №. 11. – C. 839-843.
  50. Fang Z. и др. Engineering Escherichia coli co-cultures for production of curcuminoids from glucose //Biotechnology journal. – 2018. – T. 13. – №. 5. – C. 1700576.
  51. Ferrer J. L. и др. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis //Nature structural biology. – 1999. – T. 6. – №. 8. – C. 775-784.
  52. Funa N. и др. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms //Nature. – 1999. – T. 400. – №. 6747. – C. 897-899.
  53. Furumura S. и др. Identification and functional characterization of fungal chalcone

- synthase and chalcone isomerase //Journal of Natural Products. – 2023. – T. 86. – №. 2. – C. 398-405.
54. Ganesan V. и др. Heterologous biosynthesis of natural product naringenin by co-culture engineering //Synthetic and systems biotechnology. – 2017. – T. 2. – №. 3. – C. 236-242.
  55. Gao J., Jiang L., Lian J. Development of synthetic biology tools to engineer *Pichia pastoris* as a chassis for the production of natural products //Synthetic and systems biotechnology. – 2021. – T. 6. – №. 2. – C. 110-119.
  56. Gatenbeck S., Hermodsson S. Enzymic synthesis of the aromatic product alternariol //Acta Chem Scand. – 1965. – T. 19. – C. 65-71.
  57. Ge J. и др. Integration of biological and information technologies to enhance plant autoluminescence //The Plant Cell. – 2024. – T. 36. – №. 11. – C. 4703-4715.
  58. Gengenbach B. B., Opdensteinen P., Buyel J. F. Robot cookies–plant cell packs as an automated high-throughput screening platform based on transient expression //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – T. 8. – C. 393.
  59. Gonindard C. и др. Synthetic hispidin, a PKC inhibitor, is more cytotoxic toward cancer cells than normal cells in vitro //Cell biology and toxicology. – 1997. – T. 13. – C. 141-153.
  60. Gosset G. Production of aromatic compounds in bacteria //Current opinion in biotechnology. – 2009. – T. 20. – №. 6. – C. 651-658.
  61. Green A. A., McElroy W. D. Crystalline firefly luciferase //Biochimica et biophysica acta. – 1956. – T. 20. – C. 170-176.
  62. Guo J. и др. Screening for proteins related to the biosynthesis of hispidin and its derivatives in *Phellinus igniarius* using iTRAQ proteomic analysis //BMC microbiology. – 2021. – T. 21. – C. 1-16.
  63. Guo Y. W. и др. Two type III polyketide synthases from *Polygonum cuspidatum*: gene structure, evolutionary route and metabolites //Plant biotechnology reports. – 2013. – T. 7. – C. 371-381.
  64. Gu Z. и др. Chalcone synthase is ubiquitinated and degraded via interactions with a RING-H2 protein in petals of *Paeonia* ‘He Xie’ //Journal of experimental botany. – 2019. – T. 70. – №. 18. – C. 4749-4762.
  65. Haapalainen A. M., Meriläinen G., Wierenga R. K. The thiolase superfamily: condensing enzymes with diverse reaction specificities //Trends in biochemical sciences. – 2006. – T. 31. – №. 1. – C. 64-71.
  66. Hagen A. и др. Engineering a polyketide synthase for in vitro production of adipic acid //ACS synthetic biology. – 2016. – T. 5. – №. 1. – C. 21-27.
  67. Hai Y., Huang A., Tang Y. Biosynthesis of amino acid derived  $\alpha$ -pyrones by an NRPS–NRPKS hybrid megasynthetase in fungi //Journal of natural products. – 2020. – T. 83. – №. 3. – C. 593-600.
  68. Hall M. P. и др. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate //ACS chemical biology. – 2012. – T. 7. – №. 11. – C. 1848-1857.
  69. Halpin C. Lignin engineering to improve saccharification and digestibility in grasses //Current opinion in biotechnology. – 2019. – T. 56. – C. 223-229.
  70. Harvey E. N. A history of luminescence from the earliest times until 1900 //Memoirs of the American Philosophical Society, v. 44. – 1957.
  71. Hashimoto M., Nonaka T., Fujii I. Fungal type III polyketide synthases //Natural Product Reports. – 2014. – T. 31. – №. 10. – C. 1306-1317.
  72. Hernández-Chávez G., Martínez A., Gosset G. Metabolic engineering strategies for caffeic acid production in *Escherichia coli* //Electronic Journal of Biotechnology. –

2019. – T. 38. – C. 19-26.
73. Hobbs C. Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing, and culture. – Book Publishing Company, 2002.
  74. Hoffmann L. и др. Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis //The Plant Cell. – 2004. – T. 16. – №. 6. – C. 1446-1465.
  75. Hong J., Im D. K., Oh M. K. Investigating E. coli coculture for resveratrol production with <sup>13</sup>C metabolic flux analysis //Journal of agricultural and food chemistry. – 2020. – T. 68. – №. 11. – C. 3466-3473.
  76. Hoshino A. и др. Generation of yellow flowers of the Japanese morning glory by engineering its flavonoid biosynthetic pathway toward aurones //Plant and Cell Physiology. – 2019. – T. 60. – №. 8. – C. 1871-1879.
  77. Huang Q., Lin Y., Yan Y. Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing Escherichia coli strain //Biotechnology and bioengineering. – 2013. – T. 110. – №. 12. – C. 3188-3196.
  78. Hwang B. S. и др. Anti-influenza activities of polyphenols from the medicinal mushroom *Phellinus baumii* //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2015. – T. 25. – №. 16. – C. 3256-3260.
  79. Irzik K. и др. Acyl-CoA sensing by FasR to adjust fatty acid synthesis in *Corynebacterium glutamicum* //Journal of biotechnology. – 2014. – T. 192. – C. 96-101.
  80. Isakov N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression //Seminars in cancer biology. – Academic Press, 2018. – T. 48. – C. 36-52.
  81. Jez J. M., Bowman M. E., Noel J. P. Structure-guided programming of polyketide chain-length determination in chalcone synthase //Biochemistry. – 2001. – T. 40. – №. 49. – C. 14829-14838.
  82. Jian W. и др. SlMYB75, an MYB-type transcription factor, promotes anthocyanin accumulation and enhances volatile aroma production in tomato fruits //Horticulture research. – 2019. – T. 6.
  83. Kallscheuer N., Marienhagen J. *Corynebacterium glutamicum* as platform for the production of hydroxybenzoic acids //Microbial cell factories. – 2018. – T. 17. – C. 1-13.
  84. Kallscheuer N. и др. Identification of the phd gene cluster responsible for phenylpropanoid utilization in *Corynebacterium glutamicum* //Applied microbiology and biotechnology. – 2016. – T. 100. – C. 1871-1881.
  85. Kallscheuer N. и др. Construction of a *Corynebacterium glutamicum* platform strain for the production of stilbenes and (2S)-flavanones //Metabolic engineering. – 2016. – T. 38. – C. 47-55.
  86. Kapila J. и др. An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves //Plant science. – 1997. – T. 122. – №. 1. – C. 101-108.
  87. Kaskova Z. M. и др. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence //Science advances. – 2017. – T. 3. – №. 4. – C. e1602847.
  88. 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 //Chemical Society Reviews. – 2016. – T. 45. – №. 21. – C. 6048-6077.
  89. Katsuyama Y. и др. Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa* //Journal of Biological Chemistry. – 2009. – T. 284. – №. 17. – C. 11160-11170.
  90. 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.
91. Khakhar A. и др. Building customizable auto-luminescent luciferase-based reporters in plants //Elife. – 2020. – Т. 9. – С. e52786.
  92. Khater S. и др. SBSPKSv2: structure-based sequence analysis of polyketide synthases and non-ribosomal peptide synthetases //Nucleic acids research. – 2017. – Т. 45. – №. W1. – С. W72-W79.
  93. Kim J. I. и др. Glucosinolate and phenylpropanoid biosynthesis are linked by proteasome-dependent degradation of PAL //New Phytologist. – 2020. – Т. 225. – №. 1. – С. 154-168.
  94. Kim S. S. и др. LAP6/POLYKETIDE SYNTHASE A and LAP5/POLYKETIDE SYNTHASE B encode hydroxyalkyl  $\alpha$ -pyrone synthases required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* //The Plant Cell. – 2010. – Т. 22. – №. 12. – С. 4045-4066.
  95. 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.
  96. Krivoruchko A., Nielsen J. Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* //Current opinion in biotechnology. – 2015. – Т. 35. – С. 7-15.
  97. Kulkarni S. S., Cantó C. The molecular targets of resveratrol //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. – 2015. – Т. 1852. – №. 6. – С. 1114-1123.
  98. Lavhale S. G., Kalunke R. M., Giri A. P. Structural, functional and evolutionary diversity of 4-coumarate-CoA ligase in plants //Planta. – 2018. – Т. 248. – С. 1063-1078.
  99. 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.
  100. Lee M. E. и др. A highly characterized yeast toolkit for modular, multipart assembly //ACS synthetic biology. – 2015. – Т. 4. – №. 9. – С. 975-986.
  101. Leonard E. и др. Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoids //Molecular pharmaceutics. – 2008. – Т. 5. – №. 2. – С. 257-265.
  102. Lešnik U. и др. Regulatory elements in tetracycline-encoding gene clusters: the *otcG* gene positively regulates the production of oxytetracycline in *Streptomyces rimosus* //Food Technology and Biotechnology. – 2009. – Т. 47. – №. 3. – С. 323-330.
  103. Lian J. и др. Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains //Metabolic engineering. – 2014. – Т. 24. – С. 139-149.
  104. Li H. и др. Effects of metabolic pathway gene copy numbers on the biosynthesis of (2S)-naringenin in *Saccharomyces cerevisiae* //Journal of Biotechnology. – 2021. – Т. 325. – С. 119-127.
  105. Lim C. G. и др. High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli* //Applied and environmental microbiology. – 2011. – Т. 77. – №. 10. – С. 3451-3460.
  106. Lim J. и др. Solution structures of the acyl carrier protein domain from the highly reducing type I iterative polyketide synthase CalE8 //PLoS One. – 2011. – Т. 6. – №. 6. – С. e20549.

107. Li M. и др. De novo production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae* //Metabolic Engineering. – 2015. – Т. 32. – С. 1-11.
108. Lim Y. P., Go M. K., Yew W. S. Exploiting the biosynthetic potential of type III polyketide synthases //Molecules. – 2016. – Т. 21. – №. 6. – С. 806.
109. Linke D. и др. Cold generation of smoke flavour by the first phenolic acid decarboxylase from a filamentous ascomycete–*Isaria farinosa* //Fungal biology. – 2017. – Т. 121. – №. 9. – С. 763-774.
110. Lin Y. C. Functional analysis of anther-specific genes essential for pollen exine development and male fertility in tobacco //Диссертация, Университет Гонконга. – 2012. – Т. 2012. – С. 1-0.
111. Liu C., Li S. Engineered biosynthesis of plant polyketides by type III polyketide synthases in microorganisms //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Т. 10. – С. 1017190.
112. Liu D. и др. Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. – 2012.
113. Liu Q. и др. De novo biosynthesis of bioactive isoflavonoids by engineered yeast cell factories //Nature communications. – 2021. – Т. 12. – №. 1. – С. 6085.
114. Liu Q. и др. Rewiring carbon metabolism in yeast for high level production of aromatic chemicals //Nature communications. – 2019. – Т. 10. – №. 1. – С. 4976.
115. Liu R., Deng Z., Liu T. *Streptomyces* species: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction //Metabolic engineering. – 2018. – Т. 50. – С. 74-84.
116. Li Y. и др. Functional characterization of a dehydratase domain from the pikromycin polyketide synthase //Journal of the American Chemical Society. – 2015. – Т. 137. – №. 22. – С. 7003-7006.
117. Li Z., Nair S. K. Structural basis for specificity and flexibility in a plant 4-coumarate: CoA ligase //Structure. – 2015. – Т. 23. – №. 11. – С. 2032-2042.
118. Loffredo E., Traversa A. Soil and compost humic fractions regulate the response of *Sclerotinia sclerotiorum* to exogenously added allelochemical compounds //Biology and fertility of soils. – 2014. – Т. 50. – С. 1281-1290.
119. Lubbers R. J. M. и др. *Aspergillus niger* uses the peroxisomal CoA-dependent  $\beta$ -oxidative genes to degrade the hydroxycinnamic acids caffeic acid, ferulic acid, and p-coumaric acid //Applied Microbiology and Biotechnology. – 2021. – Т. 105. – №. 10. – С. 4199-4211.
120. Lubbers R. J. M. и др. A comparison between the homocyclic aromatic metabolic pathways from plant-derived compounds by bacteria and fungi //Biotechnology advances. – 2019. – Т. 37. – №. 7. – С. 107396.
121. Lütke-Eversloh T., Santos C. N. S., Stephanopoulos G. Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications //Applied microbiology and biotechnology. – 2007. – Т. 77. – С. 751-762.
122. Lynen F., Tada M. Die biochemischen Grundlagen der «Polyacetat-Regel» //Angewandte Chemie. – 1961. – Т. 73. – №. 15. – С. 513-519.
123. 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.
124. Maeda H., Dudareva N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants //Annual review of plant biology. – 2012. – Т. 63. – №. 1. – С. 73-105.
125. Maeda M. и др. Characterization and induction of phenolic acid decarboxylase

- from *Aspergillus luchuensis* //Journal of bioscience and bioengineering. – 2018. – T. 126. – №. 2. – С. 162-168.
126. Mäkelä M. R. и др. Aromatic metabolism of filamentous fungi in relation to the presence of aromatic compounds in plant biomass //Advances in applied microbiology. – 2015. – T. 91. – С. 63-137.
  127. Ma L. Q. и др. A novel type III polyketide synthase encoded by a three-intron gene from *Polygonum cuspidatum* //Planta. – 2009. – T. 229. – С. 457-469.
  128. 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. – T. 34. – №. 4. – С. 1226-1249.
  129. Mark R. и др. Gene source screening as a tool for naringenin production in engineered *Saccharomyces cerevisiae* //ACS omega. – 2019. – T. 4. – №. 7. – С. 12872-12879.
  130. Ma S. M., Tang Y. Biochemical characterization of the minimal polyketide synthase domains in the lovastatin nonaketide synthase LovB //The FEBS journal. – 2007. – T. 274. – №. 11. – С. 2854-2864.
  131. Meslet-Cladière L. и др. Structure/function analysis of a type III polyketide synthase in the brown alga *Ectocarpus siliculosus* reveals a biochemical pathway in phlorotannin monomer biosynthesis //The Plant Cell. – 2013. – T. 25. – №. 8. – С. 3089-3103.
  132. Michely S. и др. Comparative physiology of oleaginous species from the *Yarrowia* clade //PLoS one. – 2013. – T. 8. – №. 5. – С. e63356.
  133. Milke L., Ferreira P. и др. Modulation of the central carbon metabolism of *Corynebacterium glutamicum* improves malonyl-CoA availability and increases plant polyphenol synthesis //Biotechnology and Bioengineering. – 2019. – T. 116. – №. 6. – С. 1380-1391.
  134. Milke L., Kallscheuer N. и др. Tailoring *Corynebacterium glutamicum* towards increased malonyl-CoA availability for efficient synthesis of the plant pentaketide noreugenin //Microbial cell factories. – 2019. – T. 18. – С. 1-12.
  135. Milke L., Marienhagen J. Engineering intracellular malonyl-CoA availability in microbial hosts and its impact on polyketide and fatty acid synthesis //Applied microbiology and biotechnology. – 2020. – T. 104. – №. 14. – С. 6057-6065.
  136. Minami A. и др. Predicting the chemical space of fungal polyketides by phylogeny-based bioinformatics analysis of polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase and its modification enzymes //Scientific reports. – 2020. – T. 10. – №. 1. – С. 13556.
  137. Mitiouchkina T. и др. Plants with genetically encoded autoluminescence //Nature Biotechnology. – 2020. – T. 38. – №. 8. – С. 944-946.
  138. Moreno-Giménez E. и др. GB\_SynP: a modular dCas9-regulated synthetic promoter collection for fine-tuned recombinant gene expression in plants //ACS Synthetic Biology. – 2022. – T. 11. – №. 9. – С. 3037-3048.
  139. Morita H. и др. Novel polyketides synthesized with a higher plant stilbene synthase //European Journal of Biochemistry. – 2001. – T. 268. – №. 13. – С. 3759-3766.
  140. Morita H. и др. Structural basis for the one-pot formation of the diarylheptanoid scaffold by curcuminoid synthase from *Oryza sativa* //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – T. 107. – №. 46. – С. 19778-19783.
  141. Moss G. P., Smith P. A. S., Tavernier D. Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC

- Recommendations 1995) //Pure and applied chemistry. – 1995. – Т. 67. – №. 8-9. – С. 1307-1375.
142. Naik J. и др. Molecular components associated with the regulation of flavonoid biosynthesis //Plant Science. – 2022. – Т. 317. – С. 111196.
  143. Nair D. R. и др. Two functionally distinctive phosphopantetheinyl transferases from amoeba Dictyostelium discoideum //Plos one. – 2011. – Т. 6. – №. 9. – С. e24262.
  144. Neelam, Khatkar A., Sharma K. K. Phenylpropanoids and its derivatives: biological activities and its role in food, pharmaceutical and cosmetic industries //Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2020. – Т. 60. – №. 16. – С. 2655-2675.
  145. Nivina A. и др. Evolution and diversity of assembly-line polyketide synthases: Focus review //Chemical reviews. – 2019. – Т. 119. – №. 24. – С. 12524-12547.
  146. Obst U., Lu T. K., Sieber V. A modular toolkit for generating Pichia pastoris secretion libraries //ACS Synthetic Biology. – 2017. – Т. 6. – №. 6. – С. 1016-1025.
  147. 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.
  148. Paiva P. и др. Animal fatty acid synthase: a chemical nanofactory //Chemical Reviews. – 2021. – Т. 121. – №. 15. – С. 9502-9553.
  149. Palkina K. A. и др. 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.
  150. Palkina K. A. и др. Therapeutic potential of hispidin—fungal and plant polyketide //Journal of Fungi. – 2021. – Т. 7. – №. 5. – С. 323.
  151. Palkina K. A. и др. A hybrid pathway for self-sustained luminescence //Science Advances. – 2024. – Т. 10. – №. 10. – С. eadk1992.
  152. Park J. M. и др. Cytoprotective effect of hispidin against palmitate-induced lipotoxicity in C2C12 myotubes //Molecules. – 2015. – Т. 20. – №. 4. – С. 5456-5467.
  153. Park S. R. и др. Biosynthesis of rapamycin and its regulation: past achievements and recent progress //The Journal of antibiotics. – 2010. – Т. 63. – №. 8. – С. 434-441.
  154. Pellicano F. и др. BMS-214662 induces mitochondrial apoptosis in chronic myeloid leukemia (CML) stem/progenitor cells, including CD34+ 38– cells, through activation of protein kinase C $\beta$  //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2009. – Т. 114. – №. 19. – С. 4186-4196.
  155. Peña D. A. и др. Metabolic engineering of Pichia pastoris //Metabolic engineering. – 2018. – Т. 50. – С. 2-15.
  156. Peralta-Yahya P. P. и др. Microbial engineering for the production of advanced biofuels //Nature. – 2012. – Т. 488. – №. 7411. – С. 320-328.
  157. Piel J. Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases //Natural product reports. – 2010. – Т. 27. – №. 7. – С. 996-1047.
  158. Pluskal T. и др. The biosynthetic origin of psychoactive kavalactones in kava //Nature plants. – 2019. – Т. 5. – №. 8. – С. 867-878.
  159. Price A. C. и др. Inhibition of  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin and cerulenin: structure and mechanism //Journal of Biological Chemistry. – 2001. – Т. 276. – №. 9. – С. 6551-6559.
  160. Purtov K. V. и др. The chemical basis of fungal bioluminescence //Angewandte Chemie. – 2015. – Т. 127. – №. 28. – С. 8242-8246.



161. Rademacher T. и др. Plant cell packs: a scalable platform for recombinant protein production and metabolic engineering //Plant Biotechnology Journal. – 2019. – Т. 17. – №. 8. – С. 1560-1566.
162. Rao J. P., Yasuyo S., Katsuhiko K. Genomics reveals traces of fungal phenylpropanoid-flavonoid metabolic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* //Journal of Microbiology. – 2005. – Т. 43. – №. 6. – С. 475-486.
163. Rawlings B. J. Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A—erythromycin biosynthesis) //Natural product reports. – 2001. – Т. 18. – №. 2. – С. 190-227.
164. Reimold U. и др. Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme //The EMBO journal. – 1983. – Т. 2. – №. 10. – С. 1801-1805.
165. Risdian C., Mozef T., Wink J. Biosynthesis of polyketides in *Streptomyces* //Microorganisms. – 2019. – Т. 7. – №. 5. – С. 124.
166. Roda A., Guardigli M. Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2012. – Т. 402. – С. 69-76.
167. Rodrigues J. L. и др. Heterologous production of curcuminoids //Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2015. – Т. 79. – №. 1. – С. 39-60.
168. Saito T., Kato A., Kay R. R. DIF-1 induces the basal disc of the *Dictyostelium* fruiting body //Developmental biology. – 2008. – Т. 317. – №. 2. – С. 444-453.
169. Sakamoto S. и др. Molecular cloning and characterization of type III polyketide synthase from *Plumbago zeylanica* //Journal of Asian Natural Products Research. – 2021. – Т. 23. – №. 5. – С. 478-490.
170. Samappito S. и др. Aromatic and pyrone polyketides synthesized by a stilbene synthase from *Rheum tataricum* //Phytochemistry. – 2003. – Т. 62. – №. 3. – С. 313-323.
171. Samappito S. и др. Molecular characterization of root-specific chalcone synthases from *Cassia alata* //Planta. – 2002. – Т. 216. – С. 64-71.
172. Santos C. N. S., Koffas M., Stephanopoulos G. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose //Metabolic engineering. – 2011. – Т. 13. – №. 4. – С. 392-400.
173. Sariaslani F. S. Development of a combined biological and chemical process for production of industrial aromatics from renewable resources //Annu. Rev. Microbiol. – 2007. – Т. 61. – №. 1. – С. 51-69.
174. Sarrion-Perdigones A. и др. GoldenBraid 2.0: a comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology //Plant physiology. – 2013. – Т. 162. – №. 3. – С. 1618-1631.
175. Schindelin J. и др. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis //Nature methods. – 2012. – Т. 9. – №. 7. – С. 676-682.
176. Schmelz S., Naismith J. H. Adenylate-forming enzymes //Current opinion in structural biology. – 2009. – Т. 19. – №. 6. – С. 666-671.
177. Schwarzhans J. P. и др. Non-canonical integration events in *Pichia pastoris* encountered during standard transformation analysed with genome sequencing //Scientific reports. – 2016. – Т. 6. – №. 1. – С. 38952.
178. Shakhova E. S. и др. An improved pathway for autonomous bioluminescence imaging in eukaryotes //Nature Methods. – 2024. – Т. 21. – №. 3. – С. 406-410.
179. Shalaby E., Catala A. Antioxidants. – BoD—Books on Demand, 2019.
180. Sharma A. и др. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress //Molecules. – 2019. – Т. 24. – №. 13. – С. 2452.

181. Shen B. и др. Prerequisites for combinatorial biosynthesis: evolution of hybrid NRPS/PKS gene clusters //Biocombinatorial Approaches for Drug Finding. – 2005. – С. 107-126.
182. Shimizu Y., Ogata H., Goto S. Type III polyketide synthases: functional classification and phylogenomics //ChemBioChem. – 2017. – Т. 18. – №. 1. – С. 50-65.
183. Shimokawa Y., Morita H., Abe I. Structure-based engineering of benzalacetone synthase //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2010. – Т. 20. – №. 17. – С. 5099-5103.
184. Shimomura O. Bioluminescence: chemical principles and methods. – World Scientific, 2006.
185. Shin S. Y. и др. Production of resveratrol from tyrosine in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* //Enzyme and Microbial Technology. – 2012. – Т. 51. – №. 4. – С. 211-216.
186. Shirra M. K. и др. Inhibition of acetyl coenzyme A carboxylase activity restores expression of the INO1 gene in a *snf1* mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* //Molecular and cellular biology. – 2001. – Т. 21. – №. 17. – С. 5710-5722.
187. Shomali A. и др. Diverse physiological roles of flavonoids in plant environmental stress responses and tolerance //Plants. – 2022. – Т. 11. – №. 22. – С. 3158.
188. Shomura Y. и др. Crystal structure of stilbene synthase from *Arachis hypogaea* //Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2005. – Т. 60. – №. 4. – С. 803-806.
189. Skellam E. Subcellular localization of fungal specialized metabolites //Fungal Biology and Biotechnology. – 2022. – Т. 9. – №. 1. – С. 11.
190. Srinivasan P., Smolke C. D. Biosynthesis of medicinal tropane alkaloids in yeast //Nature. – 2020. – Т. 585. – №. 7826. – С. 614-619.
191. Staunton J., Weissman K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review //Natural product reports. – 2001. – Т. 18. – №. 4. – С. 380-416.
192. Stevani C. V. и др. Current status of research on fungal bioluminescence: biochemistry and prospects for ecotoxicological application //Photochemistry and Photobiology. – 2013. – Т. 89. – №. 6. – С. 1318-1326.
193. Stewart Jr C. и др. Confluence of structural and chemical biology: plant polyketide synthases as biocatalysts for a bio-based future //Current opinion in plant biology. – 2013. – Т. 16. – №. 3. – С. 365-372.
194. 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.
195. Sutela S. и др. Phenolic compounds and expression of 4CL genes in silver birch clones and Pt4CL1a lines //PLoS One. – 2014. – Т. 9. – №. 12. – С. e114434.
196. Takeno S. и др. Development of fatty acid-producing *Corynebacterium glutamicum* strains //Applied and environmental microbiology. – 2013. – Т. 79. – №. 21. – С. 6776-6783.
197. Thapa S. B. и др. Biotechnological advances in resveratrol production and its chemical diversity //Molecules. – 2019. – Т. 24. – №. 14. – С. 2571.
198. Thorne N., Inglese J., Auld D. S. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology //Chemistry & biology. – 2010. – Т. 17. – №. 6. – С. 646-657.
199. Tian L. W. и др. Achyrodimer F, a tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibitor from an Australian fungus of the family Cortinariaceae //Bioorganic & Medicinal

- Chemistry Letters. – 2017. – Т. 27. – №. 17. – С. 4007-4010.
200. Tong Y. и др. Improving (2S)-naringenin production by exploring native precursor pathways and screening higher-active chalcone synthases from plants rich in flavonoids //Enzyme and Microbial Technology. – 2022. – Т. 156. – С. 109991.
  201. Tong Y. и др. Optimum chalcone synthase for flavonoid biosynthesis in microorganisms //Critical Reviews in Biotechnology. – 2021. – Т. 41. – №. 8. – С. 1194-1208.
  202. Trantas E., Panopoulos N., Ververidis F. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae* //Metabolic engineering. – 2009. – Т. 11. – №. 6. – С. 355-366.
  203. Urquiza-García U., Millar A. J. Expanding the bioluminescent reporter toolkit for plant science with NanoLUC //Plant Methods. – 2019. – Т. 15. – С. 1-11.
  204. Vasanthakumar A., Kattusamy K., Prasad R. Regulation of daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*—feed forward and feedback transcriptional control //Journal of basic microbiology. – 2013. – Т. 53. – №. 8. – С. 636-644.
  205. Voinnet O. и др. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus (Retraction of vol 33, pg 949, 2003) //Plant Journal. – 2015. – Т. 84. – №. 4. – С. 846-846.
  206. Waki T. и др. A conserved strategy of chalcone isomerase-like protein to rectify promiscuous chalcone synthase specificity //Nature communications. – 2020. – Т. 11. – №. 1. – С. 870.
  207. Wang H. и др. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Т. 111. – №. 25. – С. 9259-9264.
  208. 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.
  209. Wang X. и др. Identification and functional characterization of three type III polyketide synthases from *Aquilaria sinensis* calli //Biochemical and biophysical research communications. – 2017. – Т. 486. – №. 4. – С. 1040-1047.
  210. Wang Y., Chen H., Yu O. A plant malonyl-CoA synthetase enhances lipid content and polyketide yield in yeast cells //Applied microbiology and biotechnology. – 2014. – Т. 98. – С. 5435-5447.
  211. Wang Y. и др. Structural and kinetic analysis of the unnatural fusion protein 4-coumaroyl-CoA ligase:: stilbene synthase //Journal of the American Chemical Society. – 2011. – Т. 133. – №. 51. – С. 20684-20687.
  212. Wanibuchi K. и др. Enzymatic formation of an aromatic dodecaketide by engineered plant polyketide synthase //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2011. – Т. 21. – №. 7. – С. 2083-2086.
  213. Watling R. и др. A new styrylpyrone-containing *Cortinarius* from Australia. – 1992.
  214. Weber E. и др. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs //PloS one. – 2011. – Т. 6. – №. 2. – С. e16765.
  215. Wei J. и др. Transcriptome analysis reveals the putative polyketide synthase gene involved in hispidin biosynthesis in *Sanghuangporus sanghuang* //Mycobiology. – 2023. – Т. 51. – №. 5. – С. 360-371.
  216. Weissman K. J. Genetic engineering of modular PKSs: from combinatorial biosynthesis to synthetic biology //Natural product reports. – 2016. – Т. 33. – №. 2. –

- C. 203-230.
217. Wei Y. и др. Diversity of gene clusters for polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis revealed by metagenomic analysis of the yellow sea sediment //Frontiers in microbiology. – 2018. – Т. 9. – С. 295.
  218. Weninger A., Glieder A., Vogl T. A toolbox of endogenous and heterologous nuclear localization sequences for the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* //FEMS yeast research. – 2015. – Т. 15. – №. 7. – С. fov082.
  219. Wheeler T. J., Eddy S. R. nhmmer: DNA homology search with profile HMMs //Bioinformatics. – 2013. – Т. 29. – №. 19. – С. 2487-2489.
  220. Wlodek A. и др. Diversity oriented biosynthesis via accelerated evolution of modular gene clusters //Nature communications. – 2017. – Т. 8. – №. 1. – С. 1206.
  221. Wu G. и др. Metabolic burden: cornerstones in synthetic biology and metabolic engineering applications //Trends in biotechnology. – 2016. – Т. 34. – №. 8. – С. 652-664.
  222. Wu J. и др. Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli* //Scientific reports. – 2015. – Т. 5. – №. 1. – С. 13477.
  223. Wu J. и др. Modular optimization of heterologous pathways for de novo synthesis of (2S)-naringenin in *Escherichia coli* //PLoS One. – 2014. – Т. 9. – №. 7. – С. e101492.
  224. Xu B. и др. Silencing of 4-coumarate: coenzyme A ligase in switchgrass leads to reduced lignin content and improved fermentable sugar yields for biofuel production //New phytologist. – 2011. – Т. 192. – №. 3. – С. 611-625.
  225. Xu C. L. и др. Viral delivery systems for CRISPR //Viruses. – 2019. – Т. 11. – №. 1. – С. 28.
  226. Xu J., Ge X., Dolan M. C. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures //Biotechnology advances. – 2011. – Т. 29. – №. 3. – С. 278-299.
  227. Xu J., Zhang N. On the way to commercializing plant cell culture platform for biopharmaceuticals: present status and prospect //Pharmaceutical bioprocessing. – 2014. – Т. 2. – №. 6. – С. 499.
  228. Xu T. и др. Detection of organic compounds with whole-cell bioluminescent bioassays //Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Volume 1. – 2014. – С. 111-151.
  229. Xu Y. и др. Thioesterase domains of fungal nonreducing polyketide synthases act as decision gates during combinatorial biosynthesis //Journal of the American Chemical Society. – 2013. – Т. 135. – №. 29. – С. 10783-10791.
  230. Yang Y. и др. Regulating malonyl-CoA metabolism via synthetic antisense RNAs for enhanced biosynthesis of natural products //Metabolic engineering. – 2015. – Т. 29. – С. 217-226.
  231. Yan Y., Kohli A., Koffas M. A. G. Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae* //Applied and environmental microbiology. – 2005. – Т. 71. – №. 9. – С. 5610-5613.
  232. Yousfi M. и др. Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica* //Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. – 2009. – Т. 23. – №. 9. – С. 1237-1242.
  233. Yuan S. F. и др. De novo resveratrol production through modular engineering of an *Escherichia coli*–*Saccharomyces cerevisiae* co-culture //Microbial cell factories. – 2020. – Т. 19. – С. 1-12.

234. Yuzawa S. и др. Short-chain ketone production by engineered polyketide synthases in *Streptomyces albus* //Nature communications. – 2018. – Т. 9. – №. 1. – С. 4569.
235. Zeng J., Decker R., Zhan J. Biochemical characterization of a type III polyketide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces toxytricini* //Applied biochemistry and biotechnology. – 2012. – Т. 166. – С. 1020-1033.
236. Zhang H. и др. A fungal NRPS-PKS enzyme catalyses the formation of the flavonoid naringenin //Nature Communications. – 2022. – Т. 13. – №. 1. – С. 6361.
237. Zhang S. и др. Cooperative regulation of flavonoid and lignin biosynthesis in plants //Critical Reviews in Plant Sciences. – 2021. – Т. 40. – №. 2. – С. 109-126.
238. Zhang S. и др. Metabolic engineering for efficient supply of acetyl-CoA from different carbon sources in *Escherichia coli* //Microbial Cell Factories. – 2019. – Т. 18. – С. 1-11.
239. Zhang W. и др. Production of naringenin from D-xylose with co-culture of *E. coli* and *S. cerevisiae* //Engineering in Life Sciences. – 2017. – Т. 17. – №. 9. – С. 1021-1029.
240. Zhang X. и др. A proteolytic regulator controlling chalcone synthase stability and flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis* //The Plant Cell. – 2017. – Т. 29. – №. 5. – С. 1157-1174.
241. Zhang Y. и др. Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells //Journal of the American Chemical Society. – 2006. – Т. 128. – №. 40. – С. 13030-13031.
242. Zha W. и др. Improving cellular malonyl-CoA level in *Escherichia coli* via metabolic engineering //Metabolic engineering. – 2009. – Т. 11. – №. 3. – С. 192-198.
243. Zheng P. и др. Metabolic engineering and mechanical investigation of enhanced plant autoluminescence //Plant Biotechnology Journal. – 2023. – Т. 21. – №. 8. – С. 1671-1681.
244. Zhou H. и др. A fungal ketoreductase domain that displays substrate-dependent stereospecificity //Nature chemical biology. – 2012. – Т. 8. – №. 4. – С. 331-333.
245. Zhou S. и др. Fine-tuning the (2S)-naringenin synthetic pathway using an iterative high-throughput balancing strategy //Biotechnology and Bioengineering. – 2019. – Т. 116. – №. 6. – С. 1392-1404.
246. Zhou S. и др. Development of a growth coupled and multi-layered dynamic regulation network balancing malonyl-CoA node to enhance (2S)-naringenin biosynthesis in *Escherichia coli* //Metabolic engineering. – 2021. – Т. 67. – С. 41-52.
247. Zierp P. F. и др. SeMPI 2.0—a web server for PKS and NRPS predictions combined with metabolite screening in natural product databases //Metabolites. – 2020. – Т. 11. – №. 1. – С. 13.
248. *Addgene: MoClo Pichia toolkit*. [Электронный ресурс] URL: <https://www.addgene.org/kits/sieber-moclo-pichia-toolkit/> (дата обращения 31.01.2024)
249. *Addgene: MoClo plant parts kit*. [Электронный ресурс] URL: <https://www.addgene.org/kits/patron-moclo/> (дата обращения 15.12.2023)
250. *Addgene: MoClo toolkit*. [Электронный ресурс] URL: <https://www.addgene.org/kits/marillonnet-moclo/> (дата обращения 03.05.2024)
251. *QIAGEN Plasmid Kits*. [Электронный ресурс] URL: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiagen-plasmid-kits> (дата обращения 05.03.2024)

252. *Pichiagenome*. [Электронный ресурс] URL: <http://www.pichiagenome.org> (дата обращения 17.08.2023)
253. *Nano-Glo® Live Cell Assay System*. [Электронный ресурс] URL: <https://worldwide.promega.com/products/luciferase-assays/reporter-assays/nano-glo-live-cell-assay-system/?catNum=N2011> (дата обращения 18.10.2023)