

УДК 577.218

Гетерологические метаболические пути: стратегии оптимизации экспрессии в эукариотических хозяевах

Н. М. Маркина^{1,2}, А. А. Котлобай¹, А. С. Царькова^{1,3*}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия²ООО «Планта», Москва, 121205 Россия³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

*E-mail: altsarkova@gmail.com

Поступила в редакцию 15.04.2020

Принята к печати 29.04.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10966

РЕФЕРАТ Гетерологические метаболические пути представляют собой цепочки биохимических превращений, происходящие в организме после введения в него чужеродных генов. Перенос гетерологических метаболических путей в модельные организмы является одной из основных стратегий получения важных вторичных метаболитов, но, к сожалению, в большинстве случаев простого введения генов гетерологического пути недостаточно для их успешной экспрессии. Зачастую для достижения высокого выхода продукта необходимы обширные изменения в работе гетерологических генов и соответствующих ферментов. В данном обзоре мы рассмотрим основные технологии введения гетерологических путей и подробнее остановимся на основных возникающих при этом проблемах и стратегиях их преодоления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метаболические пути, гетерологическая экспрессия, вторичные метаболиты.

ВВЕДЕНИЕ

Введение гетерологических метаболических путей в модельные организмы является одной из основных стратегий получения важных вторичных метаболитов. История применения методов гетерологической экспрессии начиналась в 70-е годы XX века с введения единичных чужеродных генов в клетки организма-хозяина (называемые системами экспрессии), преимущественно в бактериальные клетки. За последние 40 лет методология экспрессии гетерологических генов значительно расширилась, что позволяет вводить в геномы различных организмов-хозяев не только отдельные гены, но и целые генные кластеры [1, 2]. Разработка новых методов гетерологической экспрессии кластеров генов породила новую область – метаболическую инженерию, успешное применение которой требует широкомасштабного анализа и умелого сочетания различных биохимических путей, образующих взаимосвязанные сети [3].

В данном обзоре рассмотрены основные методы создания гетерологических биохимических путей в различных организмах, основные проблемы, возникающие при этом, и основные подходы к их решению.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Несмотря на то что современные методы метаболической инженерии позволяют получать биологическим путем некоторые химические вещества, единого успешного подхода к гетерологической экспрессии до сих пор не существует. Для эффективного введения экзогенного метаболического пути в гетерологический организм-хозяин необходимо предпринять следующие ключевые шаги:

1. Определить гены метаболического пути, необходимые для биосинтеза целевого соединения.
2. Включить гены биосинтетического метаболического пути в подходящий стабильный вектор(ы).
3. Выбрать подходящий организм-хозяин.
4. Выбрать методы поддержания и оптимизации данного метаболического пути в гетерологическом организме-хозяине [4] (рис. 1).

Даже при соблюдении всех этих условий почти невозможно заранее предсказать, будет ли достигнута функциональная гетерологическая экспрессия генного кластера. В некоторых случаях гетерологический метаболический путь работает практически без дополнительных модификаций, но для многих

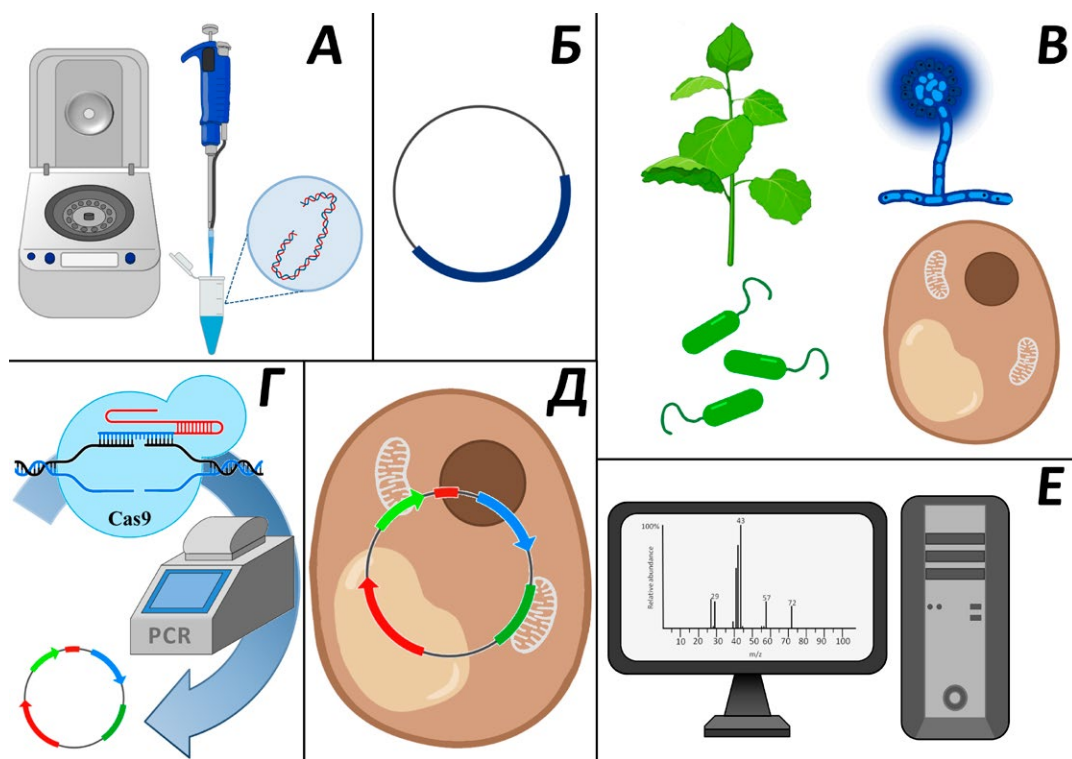


Рис. 1. Типичная схема гетерологической экспрессии кластеров генов. А – выделение ДНК из нативного продуцента; Б – введение ДНК в векторы; В – отбор гетерологического хозяина; Г – генетические манипуляции; Д – поддержание вектора в организме гетерологического хозяина; Е – оптимизация производства метаболитов

путей и организмов требуется длительная и обширная оптимизация [5–8].

Для выявления метаболических путей и управления ими в клетках-хозяевах разработаны как экспериментальные, так и расчетные и моделирующие методы. В отношении хорошо изученных метаболических путей и хорошо известных организмов-хозяев модели *in silico* обладают значительной предсказательной силой. Расчетные модели позволяют исследователям изменять экспрессию генов и уровни продукции ферментов *in silico* и непосредственно наблюдать их воздействие на динамику гетерологического пути. Эти модели, однако, сложно, а иногда и невозможно применить к экспериментальным системам, многие важные параметры которых неизвестны [9]. Более широким биоинформатическим подходом является создание метаболических моделей целых организмов [10, 11]. Помимо своей фундаментальной ценности, эти модели позволяют прогнозировать наличие и количество определенных метаболитов, что, в свою очередь, способствует оптимальному соответствию хозяина и гетерологического метаболического пути.

При внедрении экзогенной генной кассеты в организм хозяина необходимо также учитывать сложность метаболических сетей и необходимость поддержания баланса метаболитов в организме-хозяине, т.е. контролировать производство и расход жизненно важных соединений, таких, как NADH, АТР и O₂ [12]. Для прогнозирования пути разрабо-

таны различные расчетные подходы, причем основное внимание уделяется главным образом ретросинтетическим алгоритмам, генерирующим все возможные пути, связывающие определенный метаболит хозяина с желаемым целевым продуктом [13–15]. Большинство ретросинтетических алгоритмов позволяют рассчитать для целевых метаболитов кратчайшие гетерологические пути [14, 16, 17]. Этот подход, однако, не всегда оптимален, поскольку для протекания биохимических реакций обычно требуются кофакторы и пул метаболитов, которые в организме хозяина могут отсутствовать или находиться в ограниченном количестве. В этом случае лучше использовать более сложные алгоритмы, учитывающие количество участников каждой конкретной реакции [18].

ВЫБОР ХОЗЯИНА ДЛЯ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ

Выбор системы экспрессии для метаболического пути – одна из наиболее важных стадий разработки процесса с эффективной экспрессией [19]. Наиболее часто применяемые бактериальные системы экспрессии удобны в использовании, требуют недорогих питательных сред и обеспечивают высокие уровни продукции рекомбинантных белков, для них разработан набор инструментов для генетических и молекулярных манипуляций [20]. Однако в большинстве случаев из-за большого размера гетерологической биосинтетической генной кассеты и потребности

Эукариотические хозяева, подходящие для гетерологической экспрессии

Хозяин	Преимущества	Недостатки	Типичные виды
Дрожжевые культуры	Неприхотливые быстрорастущие одноклеточные организмы Высокие уровни экспрессии белка Простое регулирование типа размножения клеток (половое или бесполое) Наличие типичных ферментов фолдинга белков и посттрансляционных модификаций Наличие надежных инструментов генетической манипуляции Способность экспрессировать мембранные ферменты и секретируемые белки Признаны безопасными (GRAS) (т.е. не вырабатывают высокотоксичных или онкогенных веществ)	Потенциальное избыточное N-гликозилирование, способное привести к снижению функции белка Жесткая клеточная стенка Малое разнообразие нативных вторичных метаболитов, затрудняющее выбор надлежащих предшественников	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella</i>), <i>Candida boidinii</i> , <i>Hansenula polymorpha</i> , <i>Pichia methanolica</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
Мицелиальные грибы	Неприхотливые быстрорастущие культуры Большое разнообразие нативных вторичных метаболитов, облегчающее выбор подходящих предшественников	Избыток нативных метаболических путей – выработка желаемого продукта вынуждена конкурировать с метаболизмом хозяина Споры, опасные для здоровья Ограниченные уровни экспрессии	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Neurospora crassa</i>
Растения	Особенно пригодны для гетерологической экспрессии метаболических путей других растений Эффективная продукция крупных ферментов Хозяин может быть представлен целым организмом или клеточной культурой Возможность локализации гетерологического метаболического пути в хлоропласте	Высокая стоимость манипуляций и культивирования Сложные протоколы трансформации Низкие скорости роста и размножения	<i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Physcomitrella patens</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Культуры клеток животных	Высокоэффективные методы вирусной трансдукции Эффективное производство ферментов животного происхождения (в том числе специфические модификации белков) Отсутствие клеточной стенки – удобство в очистке продукта	Высокая стоимость культивирования Требуют сложного оборудования и специфических условий культивирования Низкая скорость роста	Клетки млекопитающих, клетки насекомых

в транскрипционном и/или посттрансляционном процессинге и модификациях чужеродных белков для гетерологической экспрессии сложных метаболических путей бактериальные организмы-хозяева непригодны [19] или требуют дополнительных модификаций [21]. К счастью, системы экспрессии генов в дрожжах и мицелиальных грибах, относительно дешевых, быстрорастущих и не требующих сложных условий культивирования организмов, зарекомендовали себя как надежные производители эукариотических белков и метаболитов. Напротив, клеточные линии насекомых и млекопитающих медленно растут, нуждаются в особых условиях культивирования, имеют более низкие уровни экспрессии и требуют трудоемкой адаптации для экспрессии метаболического пути. В таблице приведены некоторые преимущества и недостатки широко используемых эукариотических систем экспрессии гетерологических генов.

В качестве хозяев для гетерологической экспрессии широко используются одноклеточные эукариотические микроорганизмы – дрожжи [22]. Помимо низких требований к условиям культивирования, дрожжи являются хорошим объектом для экспериментальных операций с использованием широкого спектра легкодоступных инструментов метаболической и геной инженерии. Также важно, что дрожжевые клетки содержат молекулярную машину, необходимую для фолдинга белков, способны выполнять самые сложные посттрансляционные модификации, необходимые для правильного функционирования эукариотических ферментов, и могут поддерживать функциональную экспрессию ферментов, закрепленных в мембранах, например, цитохромов P450. Кроме того, дрожжам *Pichia pastoris* и *Saccharomyces cerevisiae* присвоен статус «организма, признанного безопасным» (GRAS), поскольку они

не вырабатывают никаких известных онкогенных или токсичных веществ [23–25].

В частности, удобным гетерологическим хозяином является *S. cerevisiae*, поскольку разработана обширная методология контроля экспрессии гетерологических биосинтетических метаболических путей в этом организме. Общие методы гетерологической экспрессии метаболических путей в дрожжах, а также успешные примеры гетерологического биосинтеза вторичных метаболитов в *S. cerevisiae* см. в обзоре [6].

Описана обширная библиотека конститутивных и индуцибельных промоторов с различной силой экспрессии в *P. pastoris* (например, индуцируемый метанолом промотор гена алкогольоксидазы I (P_{AOX1}), активируемый добавлением метанола и инактивируемый добавлением глюкозы, глицерина или этанола) [26]. Если требуется несколько промоторов, то избежать спонтанной рекомбинации *in vivo* можно с помощью различных индуцибельных промоторов. Для метаболической инженерии полезны также секвенированные и аннотированные геномы нескольких штаммов *P. pastoris* [27]. Кроме того, для облегчения создания векторов, совместимых с *P. pastoris*, разработано несколько специализированных наборов клонирования [28, 29].

В качестве гетерологических хозяев могут использоваться также другие типы дрожжей, например, метилотрофные дрожжи *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha* и *P. methanolica* [30] и жировые дрожжи *Yarrowia lipolytica*, способные метаболизировать сырую нефть [31, 32].

Среди различных мицелиальных грибов в качестве гетерологических хозяев наиболее часто используются *Aspergilli* [19]. К несомненным преимуществам грибов относятся простота культивирования и быстрый рост биомассы [33]. Для гетерологической экспрессии кластеров генов из других мицелиальных грибов чрезвычайно удобными в качестве хозяев могут быть виды *Aspergillus* spp., поскольку в этом случае можно использовать исходные промоторы и терминаторы. Например, кластер генов биосинтеза пенициллина был успешно перенесен в *Neurospora crassa* и *A. niger* [34]. Однако в некоторых случаях для увеличения выработки метаболитов все же необходимо заменить исходную регуляторную последовательность промотором организма-хозяина, поскольку экзогенные последовательности, как правило, относительно слабы и/или могут экспрессироваться только в определенных условиях [22, 35]. Общую информацию о стратегиях гетерологической экспрессии метаболических путей в *Aspergilli* см. в [36].

Перспективной системой экспрессии гетерологической продукции растительных природных соединений являются растения [37]. Многие биосинтети-

ческие пути растений требуют посттрансляционных модификаций, коферментов, кофакторов, регуляторов и расположены в специфических органеллах [38]. Поэтому, если целевой метаболический путь включает большие и плохо совместимые с другими системами ферменты, то в высшей степени обосновано использование метаболической инженерии растений.

При работе с растениями важно понимать, что их метаболизм значительно варьирует в зависимости от вида, ткани и стадии развития, и часто во время цветения растение меняет свой метаболический профиль почти до неузнаваемости [39]. Методы инженерии метаболизма растений рассмотрены в [40].

Следует отметить, что растения могут быть использованы в качестве системы экспрессии как в форме целого организма, так и в виде клеточной культуры. Каждый вариант имеет свои преимущества: целый организм самодостаточен и требует минимального обслуживания со стороны исследователя, а культура клеток обычно дает большее количество целевого метаболита [38]. В настоящее время в качестве источника клеточных культур особенно привлекательны более примитивные растения – мхи и водоросли [41].

Компартментами биосинтеза различных метаболитов служат хлоропласты – полуавтономные органеллы растительных клеток. Благодаря двойной мембране и высокой концентрации АТФ, а также ввиду содержания в них различных низкомолекулярных соединений эти органеллы также являются многообещающей мишенью биоинженерии. Показано, что локализация гетерологического пути в хлоропластах обычно приводит к значительному увеличению продукции целевого метаболита [42, 43].

К недостаткам растений как гетерологических хозяев относятся: сравнительно высокая стоимость разработки, сложные протоколы трансформации, медленный рост и скорость размножения, а также негативное отношение общественности к генетически модифицированным растениям.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИНЖЕНЕРИИ ВЕКТОРОВ

Выбор необходимого вектора для переноса генов метаболического пути во многом определяется организмом-хозяином планируемой гетерологической экспрессии. Вектор должен эффективно проникать в клетки-мишени, стабильно реплицироваться в выбранном хозяине либо путем включения в геном, либо в виде внегеномной ДНК [44], а кодируемые в нем гены должны эффективно транскрибироваться [4]. Векторы экспрессии можно разделить на две основные категории: внехромосомные и интегративные (рис. 2).

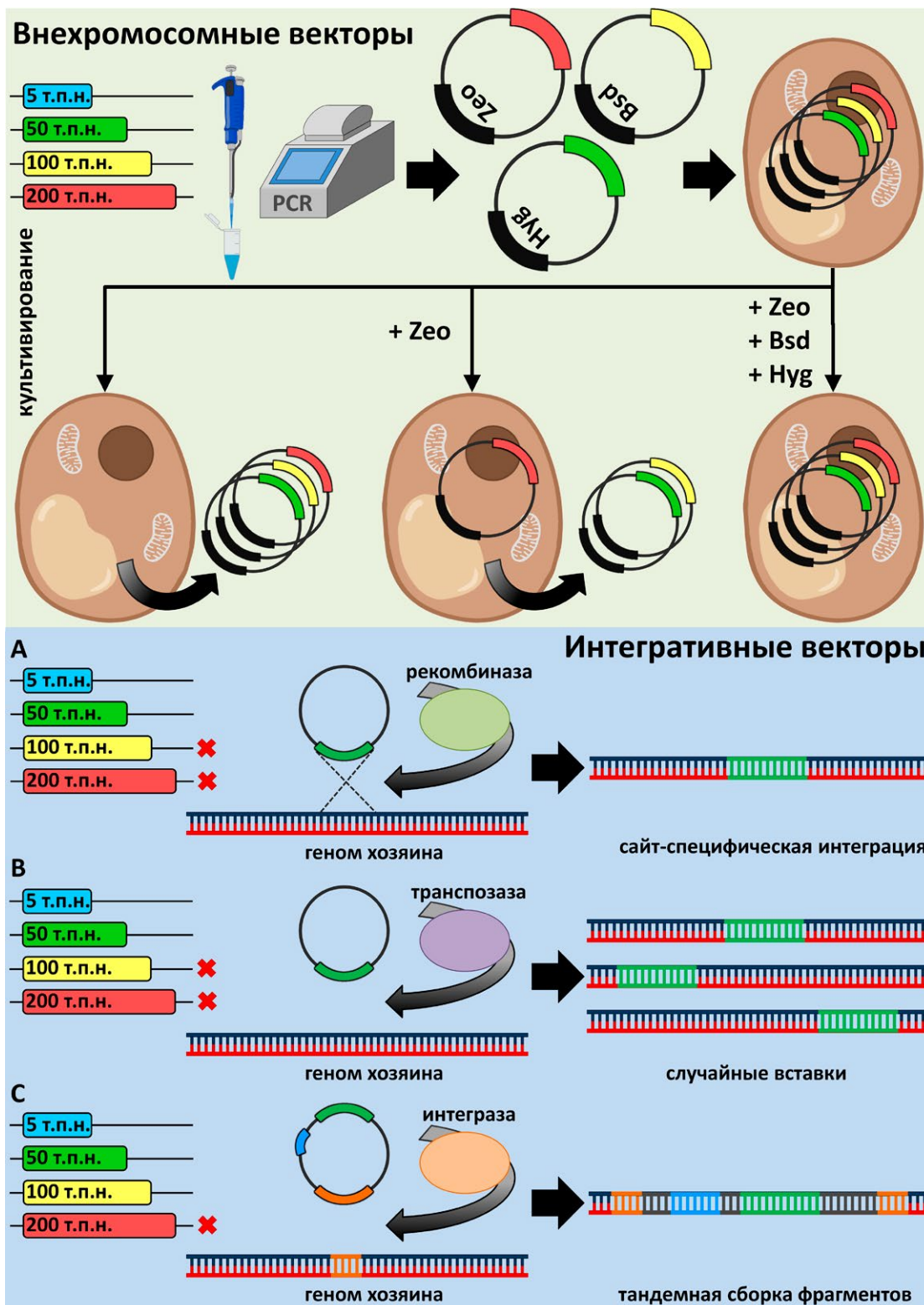


Рис. 2. Внехромосомные и интегративные системы доставки генетических конструкций. Схематически изображены механизмы включения внехромосомных (сверху) и интегративных (снизу) векторов в клетку хозяина

Внехромосомные векторы

Внехромосомные генетические элементы (плазмиды) были впервые разработаны в качестве векторной системы для бактерий более 40 лет назад [45, 46].

Сегодня плазмидные векторы считаются основным инструментом в области метаболической инженерии различных микроорганизмов. Преимущества плазмидных конструкций заключаются в простоте

их сборки с использованием методов молекулярной биологии, а также в достаточно большой генетической емкости. Недостатками плазмидных векторов являются возможность их спонтанной рекомбинации в организме-хозяине, необходимость постоянного селективного давления для предотвращения потери плазмиды и (в случае использования нескольких плазмид) потребность в большом количестве различных селективных маркеров [4].

Недавняя разработка модульной системы клонирования и коммерческая доступность стандартных частей значительно упростили разработку внехромосомных дрожжевых плазмид, делая возможной сборку как низко-, так и высококопийных плазмид с одной или несколькими кодирующими последовательностями [47].

Интегративные векторы

Альтернативный подход к доставке гетерологических генов заключается в прямом включении биосинтетических генных кассет в геном хозяина. Большинство методов хромосомной интеграции основано на процессах рекомбинации, транспозиции или вирус-опосредованной интеграции экзогенных генов в ДНК хозяина [4].

При гомологичной рекомбинации используют экзогенные векторы с целевыми генами, фланкированные сайтами рекомбинации хозяина. Эндогенные рекомбиназы хозяина способствуют сайт-специфической интеграции генов-мишеней в хромосому гетерологического хозяина. Однако эффективность гомологичной рекомбинации существенно зависит от размера генной кассеты. Поэтому для успешной интеграции и экспрессии большого метаболического пути может потребоваться несколько последовательных этапов рекомбинации [48].

Для доставки генов на основе транспозиции используются так называемые «прыгающие гены» – транспозоны, и фермент транспозаза, распознающая специфические фланкирующие сайты целевой генной кассеты. Более длинные генные последовательности встраиваются менее эффективно, однако, в отличие от гомологичной рекомбинации, транспозоны встраиваются в случайные сайты, что приводит к различиям в уровне гетерологической экспрессии разных клонов и позволяет выбирать клоны с оптимальной продукцией целевого метаболита [49]. К дополнительным преимуществам транспозонов относится универсальность плазмидной конструкции для нескольких хозяев [4].

Вирус-опосредованная система доставки генов основана, в целом, на интегразах бактериофагов и соответствующих последовательностях интеграции. Поэтому во многих методах используют интегразу

φC31 [50, 51], интегразу φBT1 [52, 53] или несколько интеграз [54]. Эти системы могут обеспечить эффективную интеграцию в определенные места генома больших (до 100 т.п.н.) последовательностей, что позволяет осуществлять итеративную или одностадийную тандемную сборку фрагментов [52]. Очевидный изъян этой системы – потребность в специфическом молекулярном механизме, т.е. в интегразах и вспомогательных ферментах.

Независимо от выбранного способа доставки ДНК следует обратить внимание на сами вводимые кодирующие последовательности. Они могут быть получены либо непосредственно из исходных организмов, либо синтезированы химически. Последний вариант более предпочтителен, так как он также позволяет оптимизировать содержание кодонов [2, 4], улучшая тем самым уровень экспрессии гетерологических генов [25].

ОПТИМИЗАЦИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОГО ПУТИ

Гетерологическая экспрессия путей биосинтеза природных соединений представляет собой многостадийный процесс, каждый этап которого сопряжен с трудностями. Накопление этих проблем оказывает большое влияние на уровни экспрессии гетерологических генов, что приводит к низкой продукции целевых метаболитов или ее отсутствию. Выявление и устранение узких мест имеют решающее значение для успешной экспрессии гетерологического пути, что, в конечном итоге, приводит к значительному улучшению всего пути. Возможности устранения узких мест зависят от физиологических особенностей организма-хозяина, а также от свойств метаболического пути [55]. В данном разделе мы рассмотрим наиболее частые проблемы, возникающие при экспрессии гетерологических путей, и основные способы их разрешения (рис. 3).

Ингибирование продуктом и токсическая нагрузка метаболита

Одна из распространенных проблем гетерологической экспрессии – ингибирование ферментативных реакций собственными продуктами, что выражается в снижении активности фермента вплоть до полного блокирования его работы. В случае метаболических путей активность фермента может снижаться на нескольких стадиях, что приводит к значительному снижению как скорости биосинтеза, так и выхода продукта. Общим решением этой проблемы является замена таких ферментов их более устойчивыми к ингибированию мутантными формами или продуктами аллельных генов [56].

Еще одна проблема – токсичность продуктов гетерологического метаболического пути для клеток-

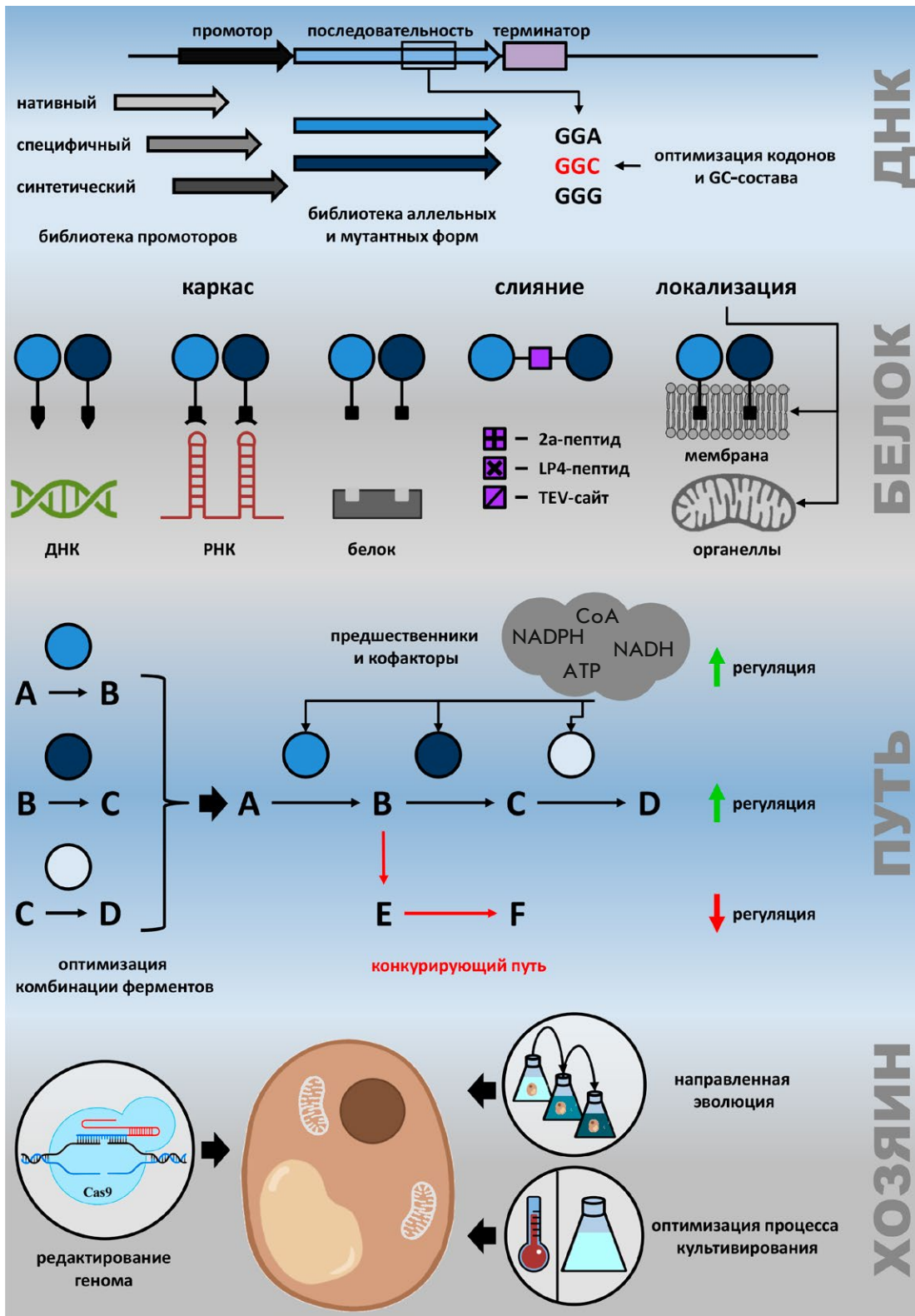


Рис. 3. Схематичное изображение подходов к оптимизации экспрессии гетерологических путей на уровне ДНК, белков, целого пути и организма-хозяина. Возможные стратегии на уровне манипуляций с ДНК включают в себя выбор наилучших комбинаций регуляторных последовательностей, аллельных или мутантных форм кодирующих последовательностей и оптимального состава GC и кодонов. Инструменты внесения улучшений на уровне белка основаны на создании каркасов, удерживающих ферменты одного пути вместе, или на создании белков слияния (с возможностью расщепления соединения или без). Оптимизация на уровне целого пути подразумевает выбор наилучших сочетаний ферментов, усиление целевых и подавление конкурирующих путей, а также увеличение доступности субстратов и кофакторов. Наконец, улучшения на уровне организма-хозяина включают редактирование его генома, направленную эволюцию и подбор оптимальных условий культивирования

хозяев [52]. Для снижения метаболической нагрузки на клетки организма-хозяина и повышения выхода желаемых метаболитов можно предпринять некоторые меры, зависящие от того, какое соединение токсично – промежуточный или конечный продукт. Негативное воздействие промежуточных продуктов можно снизить либо путем ускорения их превращения в следующее соединение [56], либо путем направленной эволюции штамма-хозяина [57]. В случае токсичности конечного продукта может применяться направленная эволюция – постепенное повышение устойчивости хозяина к токсичному метаболиту в условиях его постоянной нагрузки [58]. Однако, к сожалению, в некоторых случаях не существует очевидного рецепта решения проблемы снижения метаболической токсичности, тогда единственной возможностью сокращения нагрузки остается снижение выхода продукта [59].

Оптимизация регуляторных последовательностей

Недостаточный уровень экспрессии генов гетерологического пути может быть обусловлен также использованием неоптимальных регуляторных последовательностей. Существуют два общих подхода к выбору промоторов: 1) использование при возможности нативных промоторов генов пути; 2) замена нативных промоторов регуляторной последовательностью, специфичной для хозяина. Первый подход обычно выбирают, если хозяин и организм-источник гетерологического пути филогенетически близки (например, два вида одного рода), и этот путь активен в организме-источнике [60]. Второй подход более распространен, поскольку он позволяет экспрессировать эволюционно отдаленные метаболические пути в модельных организмах-хозяевах. Очевидным недостатком этого подхода является необходимость использования более сложных процедур молекулярного клонирования, но сегодня доступен набор различных инструментов, облегчающих эту задачу [34, 36, 61, 62].

Добиться оптимального соотношения ферментов метаболического пути можно с помощью тонкой настройки регуляторной последовательности [55]. В случае некоторых путей наиболее эффективно использование эквимольного соотношения ферментов, которое можно получить, например, с помощью саморасщепляющихся белков слияния, связанных с помощью 2a-пептидной [63], LP4-пептидной [64], двойной интеиновой последовательности [65] или последовательности распознавания протеазы вируса гравировки табака (TEV) [66, 67]. Для неэквимольных соотношений полезным инструментом точной настройки уровней экспрессии ферментов будет использование промоторов различной силы. В настоя-

щее время существуют хорошо разработанные методики определения необходимой силы промоторов для каждого гена пути [68–70]. Сочетание желаемых регуляторных последовательностей легко достигается с помощью технологий Gibson assembly и модульного клонирования Golden Gate [47, 71–74].

GC-содержание и проблемы с предпочтением кодонов

Как упомянуто выше, определенная кодирующая последовательность ДНК может быть получена либо непосредственно из исходного генома, либо синтезирована химически. В последнее время легкодоступными и приемлемыми по цене стали технологии точного крупномасштабного синтеза ДНК (например, [75, 76]). Дополнительным преимуществом химического синтеза является возможность модификации кодонов в кодирующих последовательностях гетерологического пути в соответствии с параметрами организма-хозяина [2]. Показано, что улучшение состава кодонов, приводящее к увеличению экспрессии гетерологических генов [77–79], может быть проведено либо вручную с помощью баз данных [80], либо с помощью бесплатных биоинформатических инструментов оптимизации кодонов [75, 81]. В свою очередь, оптимизация кодонов приводит к оптимизации содержания GC-пар в соответствии с предпочтениями хозяина, что обеспечивает более легкую репликацию гетерологической ДНК в организме-хозяине и таким образом снижает нагрузку от гетерологического пути.

Оптимизация комбинации ферментов пути

Эффективность гетерологического пути не зависит линейно от количества копий генов, входящих в него. Продукция метаболитов биосинтетического пути с увеличением дозы генов сначала возрастает, однако затем избыточная экспрессия гетерологических белков приводит к значительному снижению выхода целевого соединения, поскольку внутриклеточное накопление метаболитов может приводить к запуску стресс-реакций, и клетки-хозяева не могут обеспечить необходимую скорость переработки накапливающихся метаболитов [25]. Поэтому добавление дополнительных копий генов полезно только в случае генов ферментов лимитирующих стадий, но изменения количества копий других генов пути на выход конечного продукта практически не влияют [82]. Например, показано, что дозирование генов эффективно при биосинтезе гетерологических β -каротиноидов в *Yarrowia lipolytica* [83].

Наиболее эффективный гетерологический путь может сочетать ферменты различного происхождения, гены которых происходят из нескольких мета-

болических путей или даже нескольких различных организмов [77]. В некоторых случаях достаточно комбинации ферментов, относящихся к родственным путям биосинтеза из разных источников [42, 84], тогда как в других требуется добавление вспомогательных генов, кодирующих белки-активаторы, например фосфопантетинтрансферазу [85].

Пространственная близость активных центров ферментов способна повышать суммарную скорость конверсии гетерологического метаболита и снижать уровень накопления промежуточных соединений. Достигнуть такого сближения можно путем прямого слияния белков между собой или формирования белковых каркасов. Преимущество формирования белковых каркасов по сравнению с непосредственным слиянием заключается в сохранении аминокислотной последовательности фермента, что, как правило, полезно для его функционирования. Используют три основных типа каркасов: ДНК-каркас, основанный на плазидах и позволяющий легко изменять расстояние между взаимодействующими белками, РНК-каркас, преимущество которого заключается в небольшом размере, и различные варианты белковых каркасов [55].

Внутриклеточная компартиментализация ферментов гетерологического пути накладывает ограничения на продукцию метаболитов. К счастью, для митохондрий, эндоплазматического ретикула, вакуолей, ядер, мембран и пероксисом эта проблема может быть решена путем совместной локализации всех ферментов в одном и том же компартменте с использованием хорошо известных сигналов локализации.

Ассоциированные с мембраной ферменты предъявляют самые строгие требования к внутриклеточной локализации, поэтому часто требуется совместная локализация всех остальных ферментов метаболитического пути в той же мембране [86]. Ранее были разработаны несколько коммерчески доступных наборов инструментов для правильного размещения ферментов пути в специфических компартментах дрожжей [86] и хлоропластов растений [42].

Конечной целью гетерологической экспрессии метаболитических путей является продукция ценных вторичных метаболитов при помощи цепочки ферментативных реакций, где размеры отдельных рекомбинантных белков не влияют на выход целевого продукта. Размер любого рекомбинантного белка характеризуется длиной кодирующей его генетической последовательности, а также диктуется пространственными ограничениями, налагаемыми клеточной и субклеточной компартиментализацией гетерологических путей в клетках-хозяевах. Таким образом, максимизация продукции гетерологических метаболитов

представляет собой многоплановую проблему оптимизации, в которой вклад эффективности белков гетерологического пути преобладает над их количествами и размерами.

Регулирование метаболитического потока и пути хозяина

Доступность субстратов может существенно повлиять на активность всего пути. Предварительный анализ потока метаболитов (MFA) с использованием ЯМР, масс-спектрологии или других метаболомных подходов [10] может облегчить планирование усиления гетерологического пути. Как правило, все методы MFA делятся на две большие группы: онлайн методы количественной оценки скорости реакций (т.е. метаболитических потоков) *in situ* и методы, основанные на сборе образцов [25]. Применение MFA позволяет определять лимитирующие стадии экспрессии гетерологического пути, идентифицировать ключевые метаболиты и последовательно оптимизировать и перенаправлять потоки метаболитов в направлении желаемого продукта. Основной способ перераспределения метаболитов в направлении гетерологического пути заключается в настройке уровней экспрессии участвующих генов, кодирующих как нативный, так и гетерологический пути [55].

Этот способ реализуется путем идентификации ключевых метаболитов, общих как для хозяина, так и для гетерологического пути. Одновременно осуществляются регуляция пути получения целевого соединения и снижение активности конкурирующих ферментов хозяина с сохранением баланса между этими двумя процессами для обеспечения жизнеспособности организма-хозяина. Усиление регуляции обычно означает активацию [87] или дублирование путей хозяина [88], а снижения активности достигают ингибированием фермента, нокдауном транскриптов или полным удалением генов конкурирующих путей [62].

Этот подход помогает одновременно достичь нескольких целей: улучшить выход конечного метаболита, усилить нужный метаболитический путь и ослабить конкурентные. Например, этот метод привел к многократному улучшению гетерологического биосинтеза альфа-санталина [89] и *n*-бутанола [90] в дрожжах путем регуляции уровней экспрессии ферментов метаболизма ацетилкофермента А (CoA).

Доступность предшественников

Другое ключевое требование для устойчивой и эффективной экспрессии гетерологического пути – доступность предшественников. Показано, что ограничивающим фактором производства гетерологического метаболита является дефицит АТФ

[91], производных CoA [92], NADH [93], NADPH [82], FMN [94], участвующих в подавляющем большинстве биосинтетических процессов. Для устранения этой проблемы предшественники и кофакторы могут быть добавлены извне или синтезированы самим организмом-хозяином. Для плохо растворимых и нестабильных субстратов последний подход более эффективен, его осуществляют активацией биосинтетических путей хозяина, подавлением конкурирующих путей или введением дополнительных гетерологических путей [95, 96].

Важно отметить, что отток метаболитов в гетерологические пути может перекрывать и усиливать вредное влияние гетерологических продуктов и ингибировать метаболизм хозяина [38]. Единой стратегии решения этой проблемы в настоящее время не существует, однако внутриклеточная компартиментализация может быть полезной как для снижения доступности ключевых метаболитов для конкурирующих путей, так и для изолирования токсичных конечных продуктов.

Редактирование генома для оптимизации гетерологического пути

Современные передовые технологии редактирования генома позволяют осуществлять беспрецедентное широкомасштабное вмешательство в геном хозяина, невозможное при использовании других подходов. Экспрессии гетерологического пути помогают такие инструменты редактирования генома, как РНК-интерференция [97], нуклеазы цинковых пальцев [98], редактирование ДНК в вилках репликации [99] и знаменитая технология CRISPR-Cas9 [10, 100, 101]. Редактирование генома также позволяет стабилизировать геном хозяина, позволяя избежать хорошо известной проблемы инактивации или рекомбинационного удаления гетерологических генов [102]. Самой масштабной формой редактирования генома является *de novo* синтез генома хозяина, содержащего нетипичные последовательности. Для многоклеточных хозяев эта область слабо развита, но несколько попыток синтеза генома дрожжей были успешными [103, 104].

Оптимизация процесса культивирования

Если использование биотехнологических методов оказалось неудачным, то к желаемому функционированию гетерологических путей может привести

корректировка протоколов культивирования хозяина. Подбор методов культивирования – процесс трудоемкий и длительный, но он может значительно улучшить экспрессию генов гетерологического пути [105]. Например, в случае токсичности исходного соединения полезным может оказаться культивирование с подпиткой – протокол, подразумевающий поэтапное добавление в питательную среду субстрата [56, 106].

Проблемы культивирования организма-хозяина также можно решить регулированием его метаболизма. Впечатляющим примером является недавнее создание нового штамма *P. pastoris*, использующего в качестве источника углерода CO₂, что переключает гетеротрофный организм на автотрофный тип питания [107].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сочетание важности многих вторичных метаболитов с их невысокой продукцией в естественных хозяевах приводит к увеличению значимости развития технологий гетерологической экспрессии. В настоящем обзоре мы проанализировали и суммировали типичные ограничивающие факторы, препятствующие гетерологической экспрессии в модельных организмах, а также предложили основные пути преодоления каждого из них, включающие наиболее передовые молекулярно-биологические инструменты. Поскольку гетерологическая экспрессия метаболических путей это не отдельный метод, а спектр разнообразных подходов, невозможно дать универсальные советы исследователям, впервые сталкивающимся с необходимостью работы в данной области. Тем не менее, множество вдохновляющих примеров эффективной гетерологической экспрессии метаболических путей не оставляют сомнений в перспективах интенсивного развития этой отрасли. Ввиду того, что запрос на гетерологическую экспрессию сложных метаболических путей повышается, основные инструменты и технологии, рассмотренные в данном обзоре, могут стать руководством для исследователей при создании новых успешных и продуктивных гетерологических экспрессионных систем и повысить эффективность применения эукариотических хозяев. ●

Работа поддержана грантом
Российского научного фонда № 17-14-01169 Р
и грантом Минобрнауки России НШ-2605.2020.А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kotlobay A.A., Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A., Marcet-Houben M., Serebrovskaya E.O., Markina N.M., Gonzalez Somermeyer L., Gorokhovatsky A.Y., Vvedensky A., Purto

V., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. № 50. P. 12728–12732.
2. Mitiochikina T., Mishin A.S., Somermeyer L.G., Markina N.M., Chepurnyh T.V., Guglya E.B., Karataeva T.A., Palkina

- K.A., Shakhova E.S., Fakhranurova L.I., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2020. P. 10.1038/s41587-020-0500-9.
3. Torres N.V., Voit E.O. *Pathway analysis and optimization in metabolic engineering.* Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2002. P. 42–74.
 4. Ongley S.E., Bian X., Neilan B.A., Müller R. // *Nat. Prod. Rep.* 2013. V. 30. № 8. P. 1121–1138.
 5. Trantas E., Panopoulos N., Verweridis F. // *Metab. Eng.* 2009. V. 11. № 6. P. 355–366.
 6. Siddiqui M.S., Thodey K., Trenchard I., Smolke C.D. // *FEMS Yeast Res.* 2012. V. 12. № 2. P. 144–170.
 7. Galanie S., Thodey K., Trenchard I.J., Interrante M.F., Smolke C.D. // *Science.* 2015. V. 349. № 6252. P. 1095–1100.
 8. Nakagawa A., Matsumura E., Koyanagi T., Katayama T., Kawano N., Yoshimatsu K., Yamamoto K., Kumagai H., Sato F., Minami H. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 10390.
 9. Weaver L.J., Sousa M.M.L., Wang G., Baidoo E., Petzold C.J., Keasling J.D. // *Biotechnol. Bioeng.* 2015. V. 112. № 1. P. 111–119.
 10. Peña D.A., Gasser B., Zanghellini J., Steiger M.G., Mattanovich D. // *Metab. Eng.* 2018. V. 50. P. 2–15.
 11. Ye R., Huang M., Lu H., Qian J., Lin W., Chu J., Zhuang Y., Zhang S. // *Bioresour. Bioprocess.* 2017. V. 4. № 1. P. 22.
 12. Chatsurachai S., Furusawa C., Shimizu H. // *BMC Bioinformatics.* 2012. V. 13. № 1. P. 93.
 13. Campodonico M.A., Andrews B.A., Asenjo J.A., Palsson B.O., Feist A.M. // *Metab. Eng.* 2014. V. 25. P. 140–158.
 14. Moriya Y., Shigemizu D., Hattori M., Tokimatsu T., Kotera M., Goto S., Kanehisa M. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. P. W138–W143.
 15. Delépine B., Duigou T., Carbonell P., Faulon J.L. // *Metab. Eng.* 2018. V. 45. P. 158–170.
 16. Orth J.D., Thiele I., Palsson B.O. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 3. P. 245–248.
 17. Chatsurachai S., Furusawa C., Shimizu H. // *J. Biosci. Bioeng.* 2013. V. 116. № 4. P. 524–527.
 18. Liu F., Vilaça P., Rocha I., Rocha M. // *Comput. Methods Programs Biomed.* 2015. V. 118. № 2. P. 134–146.
 19. Zhang H., Boghigian B.A., Armando J., Pfeifer B.A. // *Nat. Prod. Rep.* 2011. V. 28. № 1. P. 125–151.
 20. Ningyan Z., An Z. *Manual of industrial microbiology and biotechnology.* 3rd Ed. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2014. P. 145–156.
 21. Stevens D.C., Conway K.R., Pearce N., Villegas-Peñaranda L.R., Garza A.G., Boddy C.N. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 5. P. e64858.
 22. Lazarus C.M., Williams K., Bailey A.M. // *Nat. Prod. Rep.* 2014. V. 31. № 10. P. 1339–1347.
 23. Alberti F., Foster G.D., Bailey A.M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. № 2. P. 493–500.
 24. Rodriguez E., Menzella H.G., Gramajo H. // *Methods Enzymol.* 2009. V. 459. № B. P. 339–365.
 25. Yang Z., Zhang Z. // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. P. 182–195.
 26. Vogl T., Glieder A. // *N. Biotechnol.* 2013. V. 30. № 4. P. 385–404.
 27. Zahr R.J., Peña D.A., Mattanovich D., Gasser B. // *FEMS Yeast Res.* 2017. V. 17. № 7. P. fox068.
 28. Schreiber C., Müller H., Birrenbach O., Klein M., Heerd D., Weidner T., Salzig D., Czermak P. // *Microb. Cell Fact.* 2017. V. 16. № 1. P. 29.
 29. Vogl T., Ahmad M., Krainer F.W., Schwab H., Glieder A. // *Microb. Cell Fact.* 2015. V. 14. № 1. P. 103.
 30. Hartner F.S., Glieder A. // *Microb. Cell Fact.* 2006. V. 5. P. 39–59.
 31. Madzak C. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. № 11. P. 4559–4577.
 32. Quin M.B., Schmidt-Dannert C. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. V. 29. № 1. P. 55–61.
 33. Alberti F., Khairudin K., Venegas E.R., Davies J.A., Hayes P.M., Willis C.L., Bailey A.M., Foster G.D. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 1831.
 34. Yaegashi J., Oakley B.R., Wang C.C.C. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 41. № 2. P. 433–442.
 35. Sakai K., Kinoshita H., Shimizu T., Nihira T. // *J. Biosci. Bioeng.* 2008. V. 106. № 5. P. 466–472.
 36. Anyaogu D.C., Mortensen U.H. // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 77.
 37. Jeandet P., Delaunois B., Aziz A., Donnez D., Vasserot Y., Cordelier S., Courot E. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. V. 2–3. P. 579089.
 38. Ikram N.K.B.K., Zhan X., Pan X.W., King B.C., Simonsen H.T. // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 129.
 39. Li L., Zhao J., Zhao Y., Lu X., Zhou Z., Zhao C., Xu G. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 1. P. 1–10.
 40. Farré G., Blancquaert D., Capell T., van der Straeten D., Christou P., Zhu C. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014. V. 65. № 1. P. 187–223.
 41. Lohr M., Schwender J., Polle J.E.W. // *Plant Sci.* 2012. V. 185–186. P. 9–22.
 42. Gnanasekaran T., Vavitsas K., Andersen-Ranberg J., Nielsen A.Z., Olsen C.E., Hamberger B., Jensen P.E. // *J. Biol. Eng.* 2015. V. 9. P. 24–33.
 43. Bock R. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2015. V. 66. № 1. P. 211–241.
 44. Mortimer C.L., Dugdale B., Dale J.L. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015. V. 32. P. 85–92.
 45. Cohen S.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 39. P. 15521–15529.
 46. Kado C.I. *Plasmids: Biology and impact in biotechnology and discovery.* Washington, DC: American Society of Microbiology, 2014. P. 3–11.
 47. Lee M.E., DeLoache W.C., Cervantes B., Dueber J.E. // *ACS Synth. Biol.* 2015. V. 4. № 9. P. 975–986.
 48. Wang Y., Pfeifer B.A. // *Metab. Eng.* 2008. V. 10. № 1. P. 33–38.
 49. Fu J., Wenzel S.C., Perlova O., Wang J., Gross F., Tang Z., Yin Y., Stewart A.F., Müller R., Zhang Y. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 17. P. e113.
 50. Kapusi E., Kempe K., Rubtsova M., Kumlehn J., Gils M. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 9. P. e45353.
 51. Snoeck N., De Mol M.L., van Herpe D., Goormans A., Maryns I., Coussment P., Peters G., Beuprez J., De Maeseneire S.L., Soetaert W. // *Biotechnol. Bioeng.* 2019. V. 116. № 2. P. 364–374.
 52. Luo Y., Enghiad B., Zhao H. // *Nat. Prod. Rep.* 2016. V. 33. № 2. P. 174–182.
 53. Xu Z., Lee N.C.O., Dafhnis-Calas F., Malla S., Smith M.C.M., Brown W.R.A. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 1. P. e9.
 54. Lee N.C.O., Kim J.H., Petrov N.S., Lee H.S., Masumoto H., Earnshaw W.C., Larionov V., Kouprina N. // *ACS Synth. Biol.* 2018. V. 7. № 1. P. 63–74.
 55. Luo Y., Li B.Z., Liu D., Zhang L., Chen Y., Jia B., Zeng B.X., Zhao H., Yuan Y.J. // *Chem. Soc. Rev.* 2015. V. 44. № 15. P. 5265–5290.
 56. Rodrigues J.L., Prather K.L.J., Kluskens L.D., Rodrigues L.R. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015. V. 79. № 1. P. 39–60.
 57. Winkler J., Reyes L.H., Kao K.C. // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 985. P. 211–222.
 58. Reyes L.H., Kao K.C. // *Methods in Molecular Biology.* 2018. V. 1671. P. 319–330.
 59. Amiri P., Shahpiri A., Asadollahi M.A., Momenbeik F., Partow S. // *Biotechnol. Lett.* 2016. V. 38. № 3. P. 503–508.
 60. Ryan K.L., Moore C.T., Panaccione D.G. // *Toxins (Basel).*

2013. V. 5. № 2. P. 445–455.
61. Montiel D., Kang H.S., Chang F.Y., Charlop-Powers Z., Brady S.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 29. P. 8953–8958.
 62. Chiang Y.M., Oakley C.E., Ahuja M., Entwistle R., Schultz A., Chang S.L., Sung C.T., Wang C.C.C., Oakley B.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. № 20. P. 7720–7731.
 63. Kim J.H., Lee S.R., Li L.H., Park H.J., Park J.H., Lee K.Y., Kim M.K., Shin B.A., Choi S.Y. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 4. P. e18556.
 64. François I.E.J.A., De Bolle M.F.C., Dwyer G., Goderis I.J.W.M., Woutors P.F.J., Verhaert P.D., Proost P., Schaaper W.M.M., Cammue B.P.A., Broekaert W.F. // *Plant Physiol.* 2002. V. 128. № 4. P. 1346–1358.
 65. Zhang B., Rapolu M., Liang Z., Han Z., Williams P.G., Su W.W. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 8541.
 66. Kapust R.B., Waugh D.S. // *Protein Expr. Purif.* 2000. V. 19. № 2. P. 312–318.
 67. Geib E., Brock M. // *Fungal Biol. Biotechnol.* 2017. V. 4. № 1. P. 13–24.
 68. Hawkins K.M., Smolke C.D. // *Nat. Chem. Biol.* 2008. V. 4. № 9. P. 564–573.
 69. Du J., Yuan Y., Si T., Lian J., Zhao H. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 18. P. e142.
 70. Yuan Y., Du J., Zhao H. // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 985. P. 177–209.
 71. Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison C.A., Smith H.O. // *Nat. Methods*. 2009. V. 6. № 5. P. 343–345.
 72. Iverson S.V., Haddock T.L., Beal J., Densmore D.M. // *ACS Synth. Biol.* 2016. V. 5. № 1. P. 99–103.
 73. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 2. P. e16765.
 74. Engler C., Youles M., Gruetzner R., Ehnert T.M., Werner S., Jones J.D.G., Patron N.J., Marillonnet S. // *ACS Synth. Biol.* 2014. V. 3. № 11. P. 839–843.
 75. <https://eu.idtdna.com/pages/products/custom-dna-rna/large-scale-synthesis>
 76. <https://www.wistbioscience.com/>
 77. Lussier F.X., Colatriano D., Wiltshire Z., Page J.E., Martin V.J.J. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2012. V. 3. № 4. P. e201210020.
 78. Plotkin J.B., Kudla G. // *Nat. Rev. Genet.* 2011. V. 12. P. 32–42.
 79. Kwon K.C., Chan H.T., León I.R., Williams-Carrier R., Barkan A., Daniell H. // *Plant Physiol.* 2016. V. 172. P. 62–77.
 80. Athey J., Alexaki A., Osipova E., Rostovtsev A., Santana-Quintero L.V., Katneni U., Simonyan V., Kimchi-Sarfaty C. // *BMC Bioinformatics*. 2017. V. 18. № 1. P. 391–400.
 81. <https://www.benchling.com/>
 82. Otto M., Teixeira P.G., Vizcaino M.I., David F., Siewers V. // *Microb. Cell Fact.* 2019. V. 18. № 1. P. 205–221.
 83. Gao S., Tong Y., Zhu L., Ge M., Zhang Y., Chen D., Jiang Y., Yang S. // *Metab. Eng.* 2017. V. 41. P. 192–201.
 84. Carlsen S., Ajikumar P.K., Formenti L.R., Zhou K., Phon T.H., Nielsen M.L., Lantz A.E., Kielland-Brandt M.C., Stephanopoulos G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. № 13. P. 5753–5769.
 85. Rugbjerg P., Naesby M., Mortensen U.H., Frandsen R.J.N. // *Microb. Cell Fact.* 2013. V. 12. № 1. P. 31–39.
 86. Avalos J.L., Fink G.R., Stephanopoulos G. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 4. P. 335–341.
 87. Sha C., Yu X.W., Zhang M., Xu Y. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 40. № 11. P. 1241–1249.
 88. Naqvi S., Zhu C., Farre G., Sandmann G., Capell T., Christou P. // *Plant Biotechnol. J.* 2011. V. 9. № 3. P. 384–393.
 89. Chen Y., Daviet L., Schalk M., Siewers V., Nielsen J. // *Metab. Eng.* 2013. V. 15. № 1. P. 48–54.
 90. Lian J., Si T., Nair N.U., Zhao H. Food, Pharmaceutical and Bioengineering Division 2014 – Core Programming Area at the 2014 AIChE Annual Meeting. Atlanta, AIChE, 2014. P. 750–760.
 91. Marsafari M., Xu P. // *Metab. Eng. Commun.* 2020. V. 10. № 1. P. e00121.
 92. Lv Y., Marsafari M., Koffas M., Zhou J., Xu P. // *ACS Synth. Biol.* 2019. V. 8. № 11. P. 2514–2523.
 93. de Jong B.W., Shi S., Siewers V., Nielsen J. // *Microb. Cell Fact.* 2014. V. 13. P. 39–48.
 94. Weber H.E., Gottardi M., Brückner C., Oreb M., Boles E., Tripp J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2017. V. 83. № 10. P. e03472-16.
 95. Brown S., Clastre M., Courdavault V., O'Connor S.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 11. P. 3205–3210.
 96. Ghosh A., Zhao H., Price N.D. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 11. P. e27316.
 97. Si T., Luo Y., Bao Z., Zhao H. // *ACS Synth. Biol.* 2015. V. 4. № 3. P. 283–291.
 98. Miller J.C., Holmes M.C., Wang J., Guschin D.Y., Lee Y.L., Rupniewski I., Beausejour C.M., Waite A.J., Wang N.S., Kim K.A., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. № 7. P. 778–785.
 99. Barbieri E.M., Muir P., Akhuetie-Oni B.O., Yellman C.M., Isaacs F.J. // *Cell*. 2017. V. 171. № 6. P. 1453–1467.
 100. Gassler T., Heisteringer L., Mattanovich D., Gasser B., Prielhofer R. // *Methods in Molecular Biology*. 2019. V. 1923. P. 211–225.
 101. Leynaud-Kieffer L.M.C., Curran S.C., Kim I., Magnuson J.K., Gladden J.M., Baker S.E., Simmons B.A. // *PLoS One*. 2019. V. 14. № 1. P. e0210243.
 102. Tyo K.E.J., Ajikumar P.K., Stephanopoulos G. // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. № 8. P. 760–765.
 103. Dymond J.S., Richardson S.M., Coombes C.E., Babatz T., Muller H., Annaluru N., Blake W.J., Schwerzmann J.W., Dai J., Lindstrom D.L., et al. // *Nature*. 2011. V. 477. № 7365. P. 471–476.
 104. Wang Y., Shen Y., Gu Y., Zhu S., Yin Y. // *Genomics, Proteomics Bioinforma.* 2018. V. 16. P. 10–16.
 105. Looser V., Bruhlmann B., Bumbak F., Stenger C., Costa M., Camattari A., Fotiadis D., Kovar K. // *Biotechnol. Adv.* 2014. V. 33. № 6. P. 1177–1193.
 106. Yang Z., Zhang Z. // *Biotechnol. Biofuels*. 2018. V. 11. № 1. P. 35–50.
 107. Gassler T., Sauer M., Gasser B., Egermeier M., Troyer C., Causon T., Hann S., Mattanovich D., Steiger M.G. // *Nat. Biotechnol.* 2020. V. 38. № 2. P. 210–216.