

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ — ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПУТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

А. Е. Блохина^{1,2}, К. А. Палкина¹, Е. С. Шахова¹, А. К. Малышевская^{1,2}, З. М. Осипова^{1,3}, Н. М. Мышкина¹ ✉

¹ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Лекарственные препараты играют неоспоримую роль в продлении жизни и повышении ее качества. Для получения лекарственных соединений исследователи традиционно обращаются к природным источникам и химическому синтезу, однако в настоящее время активно развиваются биотехнологические методы, позволяющие внедрять группы генов, кодирующие новые метаболические пути, в геномы гетерологических хозяев и регулировать активность их собственных метаболических путей. Такой подход дает возможность воспроизводить биосинтез биологически активных соединений в гетерологических хозяевах, сочетает достоинства традиционных методов их получения и обходит недостатки этих методов. С нашей точки зрения, применение метаболической инженерии для получения лекарственных соединений приобретает все большее значение в производстве.

Ключевые слова: гетерологическая экспрессия генов, метаболические пути, метаболическая инженерия, биосинтез лекарственных соединений

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-74-00075, <https://rscf.ru/project/21-74-00075/>

Благодарности: научному сотруднику лаборатории химии метаболитических путей А. С. Щеглову за ценные критические замечания.

Вклад авторов: А. Е. Блохина, К. А. Палкина, Е. С. Шахова, А. К. Малышевская, З. М. Осипова — анализ литературы, обработка данных, Н. М. Мышкина — анализ литературы, обработка данных, руководство проектом, написание статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Надежда Михайловна Мышкина
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, Россия; markina.nadya@gmail.com

Статья получена: 05.04.2023 **Статья принята к печати:** 19.04.2023 **Опубликована онлайн:** 26.04.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.014

METABOLIC ENGINEERING IS A PROMISING WAY TO GENERATE HIGHLY EFFECTIVE PRODUCERS OF BIOACTIVE SUBSTANCES

Blokhina AE^{1,2}, Palkina KA¹, Shakhova ES¹, Malyshevskaya AK^{1,2}, Osipova ZM^{1,3}, Myshkina NM¹ ✉

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Medicines play an indisputable role in life extension and improvement of the quality of life. To obtain medicinal compounds, researchers traditionally rely on natural sources and chemical synthesis, however, currently developing biotechnological methods allow one to introduce the group of genes encoding new metabolic pathways into the genomes of heterologous hosts and regulate activity of the hosts' intrinsic metabolic pathways. Such an approach makes it possible to reproduce biosynthesis of bioactive substances in heterologous hosts, the approach combines the benefits of conventional methods and works around the shortcomings of those. In our view, the use of metabolic engineering to obtain medicinal compounds is becoming increasingly important for their production.

Keywords: heterologous gene expression, metabolic pathways, metabolic engineering, biosynthesis of medicinal compounds

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation Grant № 21-74-00075, <https://rscf.ru/project/21-74-00075/>

Acknowledgements: the authors would like to thank A.S. Sheglov, research fellow at the Laboratory of Chemistry of Metabolic Pathways, for valuable criticisms.

Author contribution: Blokhina AE, Palkina KA, Shakhova ES, Malyshevskaya AK, Osipova ZM — literature review, data processing; Myshkina NM — literature review, data processing, project management, manuscript writing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nadezhda M. Myshkina
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997, Russia; markina.nadya@gmail.com

Received: 05.04.2023 **Accepted:** 19.04.2023 **Published online:** 26.04.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.014

Живые организмы, особенно грибы и растения, являются традиционными источниками биологически активных соединений и лекарственных средств. Однако извлечение этих веществ из природных источников может быть сложным и дорогостоящим процессом из-за их низкого содержания. Развитие методов органического синтеза обеспечило прорыв в производстве лекарств [1], однако не все природные соединения рационально получать химическим путем из-за многостадийности синтетических путей, требований к оптической активности и низких выходов чистого вещества [2, 3]. Биотехнология предлагает альтернативный подход, что позволяет производить лекарственные соединения в гетерологических хозяевах [4], таких как бактерии, дрожжи, растения, водоросли и

плесневые грибы, многие из которых совмещают в себе свойства быстрого роста, простоты культивирования и ее невысокой стоимости.

Экспрессия гетерологических генов предоставляет возможности для программирования новых свойств организма хозяина на клеточном и организменном уровнях, включая продукцию атипичных для него веществ в больших количествах [5]. Поскольку биологически активные соединения обычно не могут быть закодированы одним геном, все более популярными становятся проекты метаболической инженерии целых биохимических путей. Интеграцию длинных мультигенных конструкций в геном организма хозяина поддерживает развитие методов сборки [6] и доставки ДНК [7]. Регулирование собственных

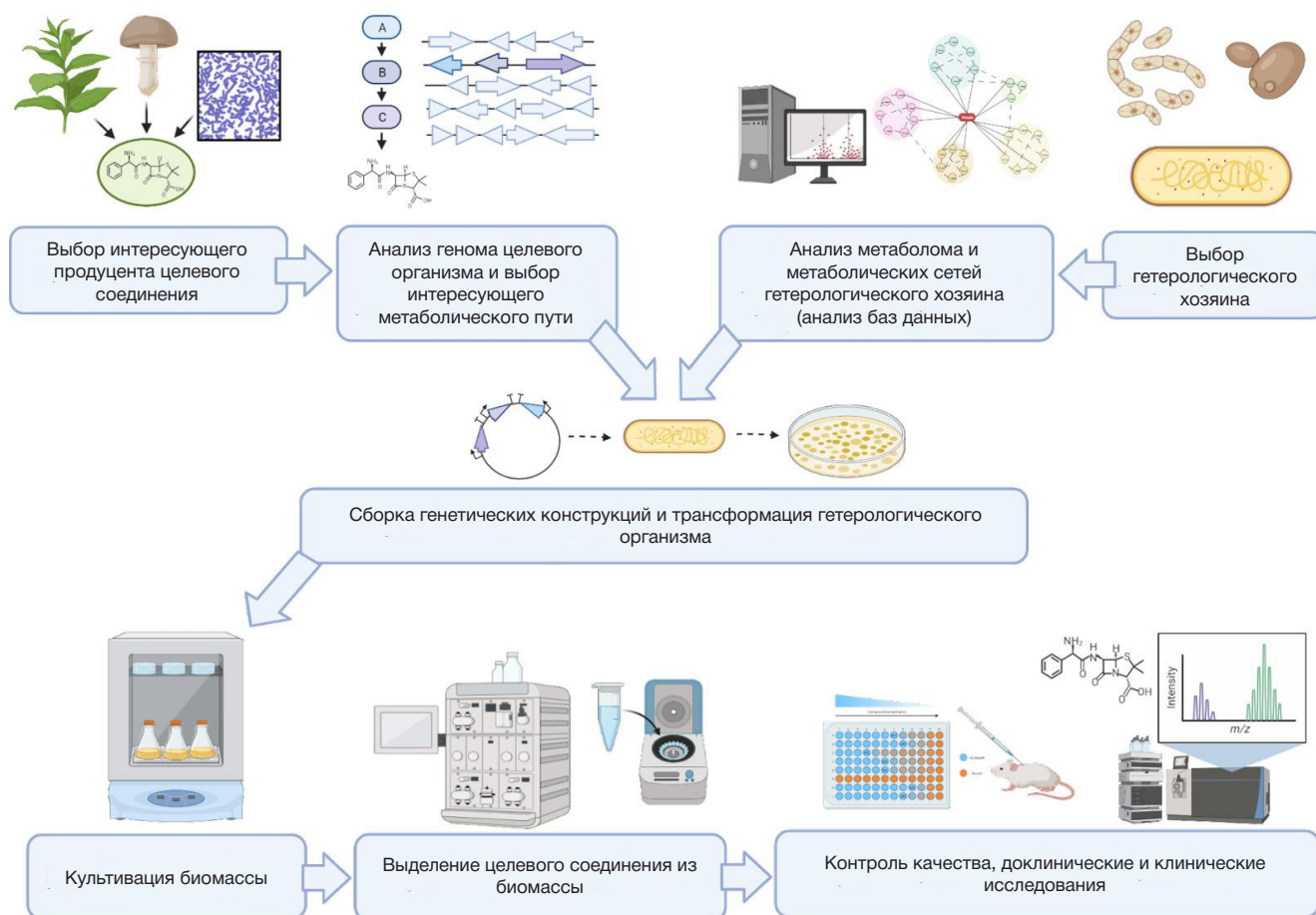


Рис. Схема современного подхода к получению биологически активных соединений в гетерологических хозяевах

метаболических путей хозяина существенным образом влияет на успешность подобных проектов, поскольку позволяет клетке-хозяину производить необходимые промежуточные метаболиты в соответствующих количествах. Одним из таких примеров является, например, создание автотрофных дрожжей *Pichia pastoris* [8].

Метаболические пути в любом организме образуют сложные метаболические сети, поэтому для выбора точек регуляции метаболизма в гетерологическом хозяине крайне важно иметь детальное представление о ферментативных составляющих конкретных биосинтетических путей и их продуктах. Для этой цели могут быть использованы различные базы данных, такие как KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [9], BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase) [10] и PathBank [11], а также базы данных коэкспрессии генов, например, ATTED-II (Arabidopsis thaliana trans-factor and cis-element prediction database), которая предназначена для арабидопсиса [12]. Тем не менее, в случае малоизученных генов или организмов встроенные алгоритмы этих баз данных могут быть недостаточно информативными; тогда применяются биоинформатические инструменты, основанные на алгоритмах машинного обучения, чья предсказательная способность совершенствуется со временем [13].

После определения точек регуляции метаболизма биохимические пути могут быть настроены с помощью точечного редактирования генома и/или эпигенетических регуляций. С учетом общих тенденций перехода от ненаправленных воздействий к более специфическим, тонкое регулирование уровня экспрессии генов хозяина

становится все более популярным и доступным. Для активации генов можно использовать, в частности, гидовые РНК и искусственные транскрипционные факторы на основе Cas9 [14, 15].

Комбинированный подход по внедрению гетерологических метаболических путей и перенаправлению собственных метаболических путей хозяина (см. рисунок) приводит к впечатляющим результатам биосинтеза целевого биологически активного соединения в гетерологическом хозяине [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успехи биосинтеза лекарственных соединений с помощью метаболической инженерии основаны на комбинации нескольких ортогональных подходов. Для успешной реализации необходимо определить кратчайший метаболический путь к нужному веществу или свойству с использованием баз данных, установить лимитирующие стадии с помощью классических моделей биохимии или алгоритмов машинного обучения, выбрать оптимальный метод трансформации генома хозяина, сконструировать генетические конструкции, совместимые с выбранным хозяином, охарактеризовать метаболический ландшафт организма-хозяина и осуществить регулирование активности его собственных биохимических путей для направления метаболитных потоков в сторону гетерологического пути. Развитие современных технологий позволяет повысить эффективность каждого из этих этапов, что в итоге приводит к получению нового источника лекарственного соединения.

Литература

- Liebig J. Ueber die Zersetzung des Alkohols durch Chlor. *Ann Pharmacother.* 1832; 1: 31–32.
- Campos KR, Coleman PJ, Alvarez JC, Dreher SD, Garbaccio RM, Terrett NK, et al. The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. *Science.* 2019; 363. DOI: 10.1126/science.aat0805.
- Blakemore DC, Castro L, Churcher I, Rees DC, Thomas AW, Wilson DM, et al. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. *Nat Chem.* 2018; 10: 383–94.
- Dhakal D, Kim E-S, Koffas M. Editorial: Engineering the Microbial Platform for the Production of Biologics and Small-Molecule Medicines. *Frontiers in Microbiology.* 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02307.
- Diamos AG, Hunter JGL, Pardhe MD, Rosenthal SH, Sun H, Foster BC, et al. High Level Production of Monoclonal Antibodies Using an Optimized Plant Expression System. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019; 7: 472.
- Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One.* 2011; 6: e16765.
- Demirer GS, Zhang H, Goh NS, González-Grandío E, Landry MP. Carbon nanotube-mediated DNA delivery without transgene integration in intact plants. *Nat Protoc.* 2019; 14: 2954–71.
- Gassler T, Sauer M, Gasser B, Egermeier M, Troyer C, Causon T, et al. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO₂. *Nat Biotechnol.* 2020; 38: 210–16.
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27: 29–34.
- Schomburg I, Chang A, Hofmann O, Ebeling C, Ehrentreich F, Schomburg D. BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27: 54–56.
- Wishart DS, Li C, Marcu A, Badran H, Pon A, Budinski Z, et al. PathBank: a comprehensive pathway database for model organisms. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48: D470–8.
- Obayashi T, Kinoshita K, Nakai K, Shibaoka M, Hayashi S, Saeki M, et al. ATTED-II: a database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: D863–9.
- Costello Z, Martin HG. A machine learning approach to predict metabolic pathway dynamics from time-series multiomics data. *NPJ Syst Biol Appl.* 2018; 4: 19.
- Selma S, Sanmartín N, Espinosa-Ruiz A, Gianoglio S, Lopez-Gresa MP, Vázquez-Vilar M, et al. Custom-made design of metabolite composition in *N. benthamiana* leaves using CRISPR activators. *Plant Biotechnol J.* 2022; 20: 1578–90.
- García-Pérez E, Diego-Martín B, Quijano-Rubio A, Moreno-Giménez E, Selma S, Orzaez D, et al. A copper switch for inducing CRISPR/Cas9-based transcriptional activation tightly regulates gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Biotechnol.* 2022; 22: 12.

References

- Liebig J. Ueber die Zersetzung des Alkohols durch Chlor. *Ann Pharmacother.* 1832; 1: 31–32.
- Campos KR, Coleman PJ, Alvarez JC, Dreher SD, Garbaccio RM, Terrett NK, et al. The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. *Science.* 2019; 363. DOI: 10.1126/science.aat0805.
- Blakemore DC, Castro L, Churcher I, Rees DC, Thomas AW, Wilson DM, et al. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. *Nat Chem.* 2018; 10: 383–94.
- Dhakal D, Kim E-S, Koffas M. Editorial: Engineering the Microbial Platform for the Production of Biologics and Small-Molecule Medicines. *Frontiers in Microbiology.* 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02307.
- Diamos AG, Hunter JGL, Pardhe MD, Rosenthal SH, Sun H, Foster BC, et al. High Level Production of Monoclonal Antibodies Using an Optimized Plant Expression System. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019; 7: 472.
- Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One.* 2011; 6: e16765.
- Demirer GS, Zhang H, Goh NS, González-Grandío E, Landry MP. Carbon nanotube-mediated DNA delivery without transgene integration in intact plants. *Nat Protoc.* 2019; 14: 2954–71.
- Gassler T, Sauer M, Gasser B, Egermeier M, Troyer C, Causon T, et al. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO₂. *Nat Biotechnol.* 2020; 38: 210–16.
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27: 29–34.
- Schomburg I, Chang A, Hofmann O, Ebeling C, Ehrentreich F, Schomburg D. BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27: 54–56.
- Wishart DS, Li C, Marcu A, Badran H, Pon A, Budinski Z, et al. PathBank: a comprehensive pathway database for model organisms. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48: D470–8.
- Obayashi T, Kinoshita K, Nakai K, Shibaoka M, Hayashi S, Saeki M, et al. ATTED-II: a database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: D863–9.
- Costello Z, Martin HG. A machine learning approach to predict metabolic pathway dynamics from time-series multiomics data. *NPJ Syst Biol Appl.* 2018; 4: 19.
- Selma S, Sanmartín N, Espinosa-Ruiz A, Gianoglio S, Lopez-Gresa MP, Vázquez-Vilar M, et al. Custom-made design of metabolite composition in *N. benthamiana* leaves using CRISPR activators. *Plant Biotechnol J.* 2022; 20: 1578–90.
- García-Pérez E, Diego-Martín B, Quijano-Rubio A, Moreno-Giménez E, Selma S, Orzaez D, et al. A copper switch for inducing CRISPR/Cas9-based transcriptional activation tightly regulates gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Biotechnol.* 2022; 22: 12.