

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПОЧИНКИ ГЕНОМА

*из Курчатовского
института*

Огромное количество людей сейчас обеспокоены вопросами, болели ли они *COVID-19* и выработались ли у них антитела. Или, скажем, заболело горло, поднялась температура — это «оно» или просто легкая простуда, при которой не нужно вызывать врача и бить тревогу? Все эти вопросы нередко становятся причиной панических настроений, поскольку все тесты оказываются неточными, а результата ПЦР-диагностики порой приходится ждать неделю и больше. Об этом и многом другом — наш разговор с Максимом Владимировичем Патрушевым, заместителем руководителя Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт», кандидатом биологических наук.



Кандидат биологических наук М.В. Патрушев

— **Максим Владимирович, в Курчатовском геномном центре впервые в России проведено глубокое секвенирование отечественного сорта пшеницы «Саратовская». Расскажите, что это за исследование, чем оно интересно и почему важно.**

— Хотел бы начать с того, что в России до начала XXI в. не существовало современных возможностей для полной расшифровки генома. Президент НИЦ «Курчатowski институт» М.В. Ковальчук и академик К.Г. Скрябин создали в Курчатовском геномном центре генетическое подразделение, где впервые в нашей стране было проведено полномасштабное секвенирование генома человека. Россия стала восьмой страной в мире, которая сумела это сделать. Эти работы дали мощный толчок развитию технологий геномного секвенирования у нас в стране, создали базу для развития генетических исследований на новом уровне. Тут можно провести аналогию с событиями 1950-х гг., когда И.В. Курчатov и А.П. Александров по сути спасли отечественную генетику, создав в нашем институте генетический отдел.

Сегодня в Курчатовский геномный центр входят восемь ведущих научных организаций России, и в целом его программа направлена на развитие генетических исследований в области промышленных биотехнологий и сельского хозяйства. Что такое генетические технологии в сельском хозяйстве? Это прежде всего создание новых сортов сельскохозяйственных растений и животных. Сейчас мы сосредоточены

на растениях. Пшеница, как известно, относится к стратегическим культурам, поэтому знания о структурно-функциональных характеристиках генома пшеницы чрезвычайно важны.

— **А для чего нужны такие знания?**

— Они нужны для того, чтобы понимать, как и на что мы можем целенаправленно воздействовать, чтобы получать более ценные хозяйственные признаки у этого растения. Например, повышенная сахаристость или какие-то другие признаки, которые позволят использовать пшеницу в промышленных биотехнологиях. Ведь пшеница важна не только и даже не столько как пищевой продукт для людей и корм для животных — это один из главных видов сырья для биотехнологической промышленности. Поэтому принято решение, что совместно с Институтом цитологии и генетики в Новосибирске и Институтом сельскохозяйственных биотехнологий мы будем заниматься получением этих знаний о структуре генома отечественных сортов пшеницы.

— **Но почему именно «Саратовская»? Она какая-то особенная?**

— Мы работаем с рядом отечественных сортов, которые представляют наибольший интерес с точки зрения ценных признаков. Например, «Саратовская-29» — это сорт, который лежит в основе многих других отечественных сортов пшеницы, успешно применяемых в ряде регионов России. Именно поэтому и было принято решение начать с нее: ее гены присутствуют в других сортах. Первый этап — это секвенирование, то есть получение последовательностей ДНК этого сорта. Уже разрабатываются технологии, с помощью которых мы сможем направленно редактировать эту пшеницу для внесения определенных признаков. Но на первом этапе мы должны прочитать ее геном, чтобы точно знать, куда именно в геноме вносить изменения.

— **Речь идет не о трансгенной модификации, а именно о редактировании генома?**

— Да, и это надо особо подчеркнуть. Это не трансгенная мутация. Никакие гены извне не привносятся, будут производиться манипуляции с собственным геномом пшеницы для улучшения тех признаков, которые выберут селекционеры.

— **Я слышала, что пшеница с генетической точки зрения — очень сложно устроенный организм. Это действительно так?**

— Да, с точки зрения организации генома это один из самых сложных организмов. Вообще, растительные геномы часто преподносят нам сюрпризы по части и размеров, и организации. Сложность заключается в том, что у пшеницы полиплоидный геном, то есть очень много повторяющихся хромосом. С точки зрения секвенирования и так называемых мокрых лабораторных процедур разницы между ней и другими растениями нет, а с точки зрения последующей биоинформатической обработки появляется масса задач, которые непросто решать. Надо сказать, что пшеница и картофель, если мы говорим о сельскохозяйственных культурах, — наверное, одни из самых сложных природных объектов. В свое время даже был создан международный консорциум по расшифровке генома пшеницы, где многие страны бились над этой задачей.

— Учеными из вашего геномного центра было обнаружено девять нуклеаз, часть из которых уже получена лабораторными методами, и проводятся испытания их активности. Расскажите, пожалуйста, что это такое.

— Курчатовский геномный центр в рамках своей деятельности исследует различные организмы для того, чтобы мы не только обладали знаниями, но и находили новые молекулярные инструменты, с помощью которых можно производить манипуляции с геномом. Так называемые РНК-направляемые нуклеазы, на основе которых создаются системы для редактирования геномов, — один из таких инструментов. Самая известная из нуклеаз —

CRISPR/Cas9. О ней написано и сказано много, но на самом деле нуклеаз, аналогичных *Cas9*, которые могут с помощью РНК узнавать какой-то участок на геноме и участвовать в его редактировании, на сегодня достаточно много. И каждая из них обладает определенными характеристиками, которые могут быть в одних случаях полезны, в других — не очень. По сути, нуклеазы — это разнообразные инструменты для редактирования. И чем больше мы таких нуклеаз найдем, тем больший простор для действий у нас появится. Разработка инструментов для редактирования генома, придания живым организмам тех функций, которые им не всегда свойственны, — одно из приоритетных направлений работы Курчатовского геномного центра.

— В чем уникальность этих девяти открытых вами нуклеаз?

— Функциональная уникальность только исследуется, но примечательно то, что раньше в этих микроорганизмах таких ферментов не находили. В их изучении мы сейчас находимся на стадии исследований, поэтому, думаю, нас ждет еще немало сюрпризов. Если у них окажутся функции, которых не было у других нуклеаз, это будет важное открытие.

— А где вы берете все эти молекулярные инструменты? Ведь они, как я понимаю, могут находиться где угодно.

— Интересный вопрос. Действительно, мы научились находить все это в природе, выделять в отдельную систему и использовать вне природного носителя. Сегодня у нас есть возможность осуществлять поиск в различных экосистемах. В рамках

СПРАВКА

В Национальном исследовательском центре «Курчатовский институт» в рамках нацпроекта «Наука» создан один из трех геномных центров России. Президент НИЦ «Курчатовский институт» М.В. Ковальчук инициировал создание под эгидой института консорциума крупнейших организаций в области генетических исследований. В их числе ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Московский физико-технический институт и др. — всего восемь ведущих научных и образовательных учреждений

России, реализующих общие задачи, направленные на развитие двух из четырех направлений Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. Разработки технологий в области сельского хозяйства и промышленных биотехнологий призваны решать самые важные экономические задачи, такие как обеспечение продовольственной безопасности, создание нового технологического уклада, ориентированного на все большее внедрение природоподобных технологий.

Программа развития Курчатовского геномного центра мирового

уровня включает в себя полный цикл исследований и разработок геномов, а дорожная карта предусматривает разработку методов редактирования генома сельскохозяйственных растений, получение новых линий сельскохозяйственных растений, создание генетических баз данных объектов живой природы (цифровых двойников), важных для экономики России, разработку и внедрение большого количества микробных продуцентов для производства широкого спектра соединений — от кормовых аминокислот до лекарственных субстанций.

своей работы мы исследуем и бактерии, которые живут во льдах Арктики, в горячих источниках и других уникальных экосистемах. Хотя в обычной почве в любом московском дворе тоже можно найти очень много интересных бактерий, в которых обнаружатся какие-то важные инструменты.

— У вас есть какой-то пополняемый банк таких микроорганизмов?

— Один из источников для исследований у нас — биоресурсный центр или, проще говоря, огромная коллекция (порядка 25 тыс. штаммов микроорганизмов) НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетики. В основном это промышленные микроорганизмы, но от этого они не менее интересны с точки зрения своего внутреннего содержания. Одно из направлений нашей работы — оцифровка этой коллекции, то есть мы секвенируем ее объекты. К концу года у нас будет отсеквенировано уже более тысячи штаммов. Таким образом мы получаем информацию о структуре геномов микроорганизмов, в которых осуществляем поиск каких-либо молекулярных инструментов, в том числе нуклеаз.

Недавно мы обнаружили одну из таких нуклеаз, которая обитает в микрофлоре человеческого кишечника, в бактерии рода *Ruminococcus*. Мы предполагаем, что она подобна *Cpf1*. В первом приближении она функционирует так же. Так что с таким материалом, как микробиота человека, мы тоже работаем, и очень плотно. Ведь мы знаем, что масса организмов живут у нас в кишечнике, на коже, и все они тоже представляют собой очень интересные объекты, отдельные экосистемы. В таком ракурсе каждый из нас — особая планета. А если

говорить об информации, которую можно таким образом получить, то это не менее богатый кладезь ферментов, чем какая-нибудь экзотическая почва.

— Каким образом вы нашли эту кишечную бактерию?

— В большинстве случаев биоинформатики используют различные методы анализа гомологий, когда с помощью определенных математических алгоритмов мы можем найти нечто общее — то, что может оказаться геномом нуклеазы. Но мы предположили, что не всегда гены, которые кодируют те или иные ферменты с похожими функциями, могут быть одинаковы. Мы не первые задались этим вопросом. Следующий вопрос — как искать? Мы нашли некую закономерность: если организм производит нуклеазы, то в нем обычно присутствуют определенные гены, которые к этой нуклеазе прямого отношения не имеют. То есть вначале мы находили эти «сторонние» гены, а затем, решая обратную задачу, искали нуклеазы. Именно таким хитрым путем мы обнаружили этот фермент в геноме бактерии, которая до нас была уже хорошо исследована, но этот фермент в ней не находили.

— Какое прикладное значение может иметь открытие, связанное с этой нуклеазой?

— В зависимости от того, какие функции у этого фермента обнаружатся, у нас в руках будет еще один инструмент, важный для практической работы. Тут возможностей море — надо лишь определить задачи. Вы ведь не можете забить гвоздь без молотка, правильно? Сейчас для того, чтобы что-то отредактировать даже в экспериментальных целях, мы, как правило,



Фокусируемый ультразвуковой дезинтегратор, используемый для фрагментации ДНК (слева); экстрагирование ДНК в лаборатории Курчатовского геномного центра (справа)

покупаем ферменты за границей, нам их привозят в виде наборов, где все отлажено. А теперь у нас появляется отечественный «молоток», с помощью которого мы можем забивать именно те «гвозди», которые нам нужны. Этот «молоток» может обладать также целым набором дополнительных функций.

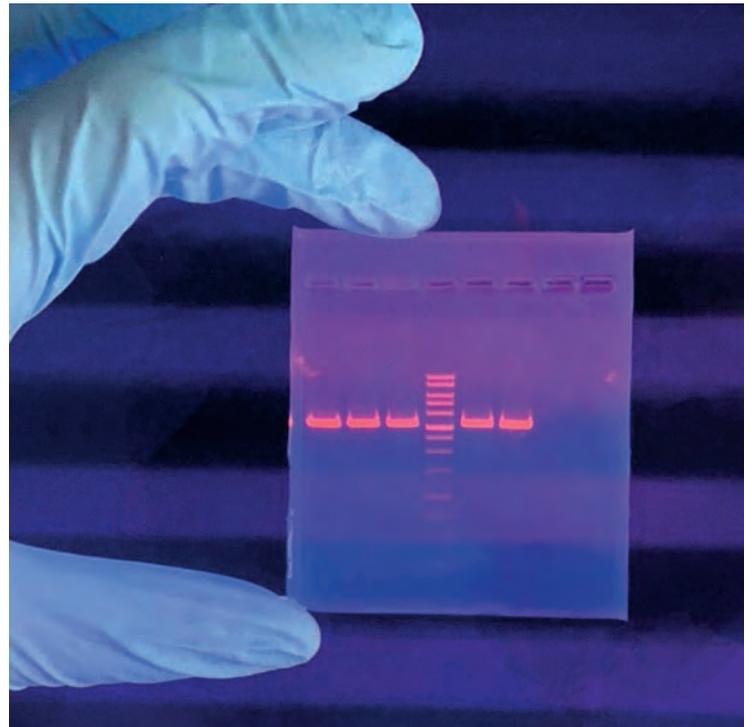
Применительно к системам редактирования геномов все это нужно для того, чтобы создавать новые штаммы-продуценты. В основном это микроорганизмы, представляющие собой своеобразные биохимические фабрики. Теоретически такую фабрику можно настроить на производство любого субстрата. В наши же задачи входит создание штаммов для производства, например аминокислот — едва ли не самого главного кормового компонента для животноводства.

— А ведь сегодня основную часть аминокислот мы тоже закупаем, поскольку отечественная промышленность по их производству была разрушена. Вы занимаетесь ее возрождением?

— В Советском Союзе на базе того самого генетического отдела Института атомной энергии им. И.В. Курчатова, преобразованного в 1968 г. в крупнейший генетический центр ГосНИИгенетика, была создана одна из самых современных на тот момент биотехнологическая промышленность. Эта отрасль почти полностью покрывала внутренние запросы страны, производя продукцию для фармацевтики, сельского хозяйства и т.д. Но в результате событий 1990-х гг. эта отрасль практически прекратила свое существование. Сегодня ясно, что нам снова нужны собственные современные технологии. А сырью, той же пшеницы, у нас даже переизбыток. Часть этого сырья продается, часть используется в хлебопекарной промышленности, в кормах, а часть просто не перерабатывается, потому что нет технологий и мощностей. Вот для этого мы ищем новые инструменты редактирования, чтобы создавать в том числе продуцентов соединений, которые важны для сельского хозяйства.

— Одна из самых актуальных тем вашего геномного центра — производство тестов, с помощью которых можно определять вирусы без лабораторного оборудования. Чем эти тесты отличаются от всех тех, которыми сегодня переполнен рынок?

— Эта тема, как вы понимаете, связана с нынешней пандемией, от которой мы



Электрофорез ДНК в агарозном геле

не могли оставаться в стороне. На сегодня Россия — один из лидеров по количеству тестов на COVID-19. Но сегодня практически все тесты проводятся двумя методами. Первый метод — полимеразная цепная реакция (ПЦР), при помощи которой мы непосредственно обнаруживаем РНК вируса в биологическом материале. Второй — иммуноферментный анализ. В этом случае мы можем обнаружить и сами белки вируса, но обычно обнаруживаем антитела к вирусу и таким образом судим о состоянии человека. Проблема в том, что для острой диагностики годится только метод ПЦР, потому что он прямо обнаруживает наличие вируса в биологическом материале. Метод прекрасен, давно используется, широко себя зарекомендовал. Но один из его недостатков — необходимость наличия лабораторий. Хотя, казалось бы, в XXI в. технологии должны быть такими, чтобы мы могли производить подобный анализ вне лаборатории, а, скажем, прямо у вас дома, когда пришел по вызову врач, или в поликлинике, где нет специализированного оборудования.

— Соответственно, и ждать результата несколько дней не надо.

— Совершенно верно. Сегодня врач приходит, забирает материал, едет в лабораторию и в лучшем случае через два-три дня

пациент получает информацию о наличии или отсутствии у себя вируса. С чем связан недостаток такой ПЦР-диагностики? Всего лишь с тем, что нужно нагревать пробирку, потому что те ферменты, которые используются для полимеразной цепной реакции, работают при высоких температурах. Понятно, что носить с собой печку ни один врач не хочет. А эта печка еще должна быть очень точной.

Смысл нашей разработки сводится к тому, что мы собираем смесь из определенных ферментов, которые по сути делают то же самое, что и обычный тест на основе ПЦР, но без нагрева. Подобные технологии в мире есть, мы здесь не первооткрыватели. Но, во-первых, их мало, во-вторых, их еще никто не использовал для диагностики. Попытки есть и в России, но на основе зарубежных ферментативных смесей. Мы же пошли прямым и простым путем — создать саму технологию, чтобы она была у нас в руках, а не где-то на Западе или Востоке ее покупали. Мы хотим наладить выпуск ферментов. Наша задача как национального исследовательского центра — решить эту проблему и отладить саму технологию изотермической амплификации, а также закрыть ее «компонентную базу», то есть отладить технологию производства необходимых ферментов. Как раз сейчас мы этим и занимаемся.

— Когда ждать готовых тестов?

— Ожидаемый выпуск прототипа такого теста планируется на осень. Конечно, тут нельзя обойтись без вопросов: зачем они будут нужны, если пандемия к этому моменту уже закончится? Здесь я, как правило, отвечаю следующее: во-первых, сегодня на рынок зачастую выходят абсолютно сырые тесты, не готовые к использованию, в результате чего мы наблюдаем так много ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Во-вторых, наша задача — это преодоление технологического барьера. Мы не производители тестов, но можем обеспечить технологическую платформу, чтобы производители тестов имели больше возможностей, большую достоверность, пользовались отечественными компонентами и могли с помощью этой платформы оперативно отреагировать на появление любой новой вирусной опасности. Сегодня как раз такое время, когда надо формировать ответ на этот технологический вызов, который обозначен в стратегии научно-технологического развития нашей страны.

— Ваши тесты могут быть использованы только для диагностики COVID-19?

— Конечно нет. Абсолютно для любого инфекционного заболевания: грипп, гепатит, ВИЧ — что угодно.

— В таком случае упреки в том, что вы слишком поздно это делаете, абсолютно несостоятельны, потому что инфекционные болезни будут с нами всегда.

— Вы правы. Пандемии будут и в дальнейшем, это неизбежно, ведь количество людей на Земле растет, а каждый человек — это резервуар для размножения вирусов. Есть очень много факторов, которые способствуют тому, чтобы появлялись новые инфекционные агенты. К этому надо быть готовыми. Хотя, что греха таить, инфекционными заболеваниями в мире занимаются мало, удельный вес исследований этой тематики был очень низок до последнего времени. Однако надо отметить, что в СССР эти работы велись очень эффективно и широко. Вспомним хотя бы вакцину против полиомиелита в 1950-х гг. Думаю, что именно созданный тогда задел в вирусологии, эпидемиологии позволил России с наименьшими по сравнению с целым рядом других стран потерями выйти из нынешней пандемии.

— Можно ли сказать, что ожидаемые биотехнологические прорывы — один из плюсов пандемии?

— Да, это правда. Сегодня огромные силы мобилизованы в ответ на этот вызов. Даже те лаборатории, которые никогда в жизни не занимались вирусами, на них переключились. Безусловно, мы получим важные результаты, хотя на это требуется какое-то время. Новые лекарства, вакцины, технологии — все это не делается за несколько недель и даже месяцев.

— Как вы думаете, наступят ли времена, когда мы сможем пойти в аптеку, приобрести ваш тест за небольшие деньги и в домашних условиях выяснить, чем больны?

— Я не вижу препятствий, чтобы все это и многое другое стало доступно каждому из нас. Думаю, это перспектива примерно пяти лет. По крайней мере, современный Курчатовский институт как головная организация программы генетических исследований в стране делает для этого все необходимое. ■

Беседовала Наталия Лескова