



ДНК, РНК, белки: подробней, еще подробней!

05 июля 2017

Ученые из Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН представили новые методы, использующие NGS секвенирование, уникальные для нашей страны, на II Всероссийской конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике», прошедшей в новосибирском Академгородке.

«Параллельно нашей конференции шел V Международный форум технологического развития «Технопром», и одна из его тематик оказалась тесно связанной с вопросами, обсуждавшимися у нас, — комментирует директор ИХБФМ СО РАН член-корреспондент РАН Дмитрий Владимирович Пышный (председатель конференции). — Речь идет о **круглом столе, посвященном геномному редактированию**, обсуждался вариант того, чтобы сделать здесь центр компетенций в этом направлении. Там же, на круглом столе, отмечалось: любое геномное редактирование невозможно без геномного секвенирования, которое отвечает не только на вопрос, исправили ли мы мутацию в конкретном месте, но и не испортили ли мы случайно другой участок генома. Участники «Технопрома» подчеркивали — в Новосибирске действительно очень мощный кластер по биотехнологиям, учитывая то, что в ИХБФМ отработаны уникальные для России методики».



Конференция была организована ИХБФМ СО РАН с участием Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН и Новосибирского государственного университета. Участвовали в ней более 150 человек, причем большая половина из них — приезжие, представители наиболее активно работающих в области секвенирования научных групп Москвы, Санкт-Петербурга, Томска, Иркутска, Улан-Удэ и Владивостока. «Одной из целей нашего форума было объединить и «заказчиков», и тех, кто предоставляет услуги секвенирования, наладить контакты, — говорит руководитель центра коллективного пользования «Геномика» СО РАН кандидат биологических наук Марсель Расимович Кабилов (руководитель оргкомитета). — Необходимо выразить благодарность за финансовую поддержку Федеральному агентству научных организаций, Российскому фонду фундаментальных исследований, генеральному спонсору конференции — фирме «Диаэм», а также компаниям «ХимЭксперт», «Хеликон», «Кайджин», «Альбиоген» и другим нашим партнерам».

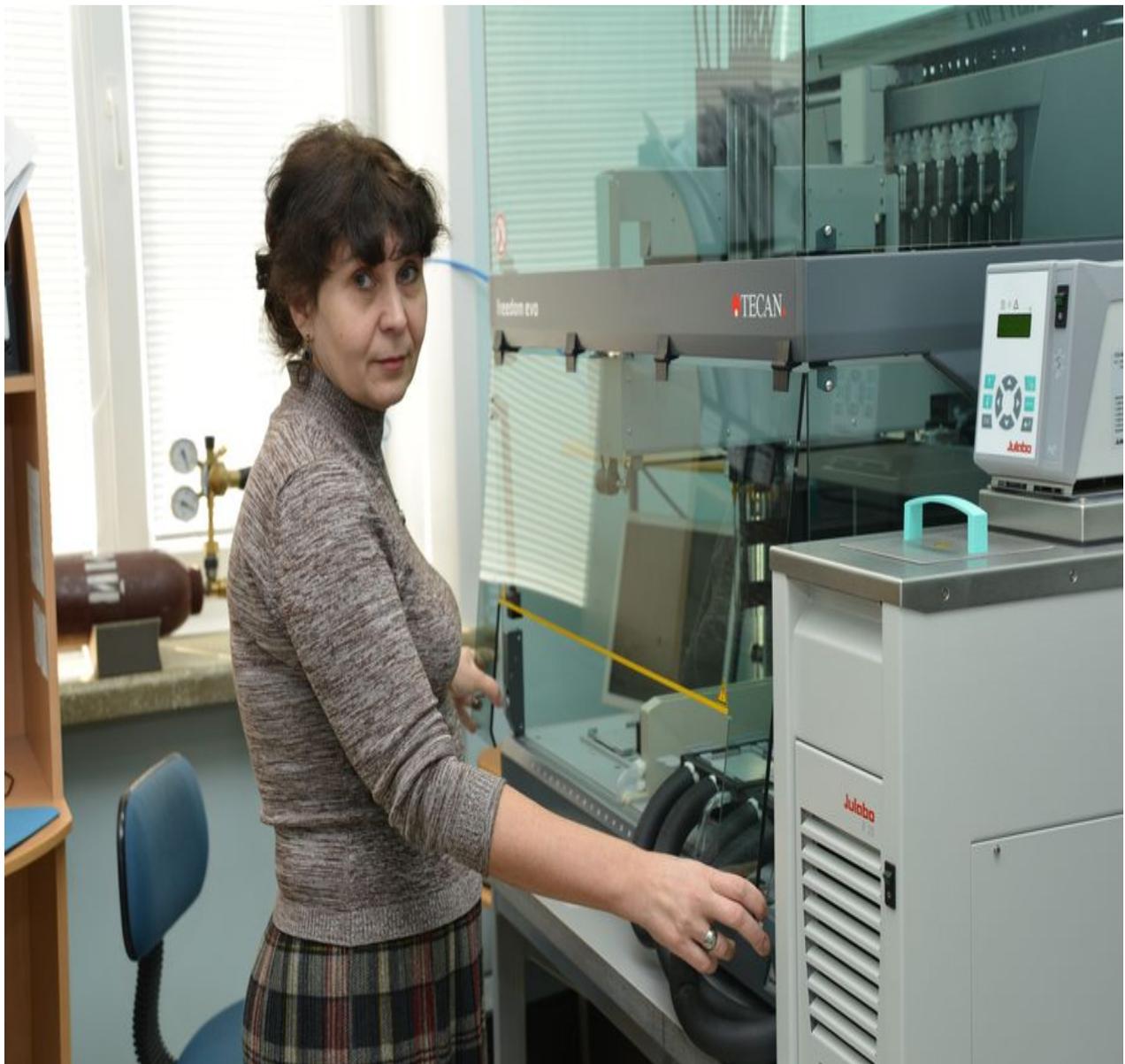
Первоначально, когда только появились геномные секвенаторы, основной задачей было тотальное секвенирование, допустим, генома бактерии или вируса. Для того времени — невероятный прорыв, однако сейчас, скорее, — обыденность, а самыми интересными стали более специфические задачи.

«С помощью геномики (если речь идет о секвенировании полных геномов) ученые способны увидеть эволюционную составляющую — какие виды базовые, кто от кого произошел и так далее, — объясняет Марсель Кабилов. — Следующий уровень — изучение внутривидовой популяции: секвенируя полные геномы, митогеномы или отдельные локусы, мы понимаем структуру популяции, а также то, что происходит с ней в данный момент и куда она движется. Далее — идем внутрь организма и пытаемся разобраться, какие процессы протекают внутри той или иной ткани. То есть если мы изучаем сложную полигенную патологию, то, анализируя

транскриптом или метилирование генома у больных и здоровых индивидов, можно выявить гены, экспрессия (синтез РНК) которых отличается, и возможно, что именно эти гены будут напрямую связаны с развитием болезни. Это даст возможность приблизиться к пониманию причин недуга, к возможной терапии или позволит выявить перспективные маркеры для разработки диагностики. Наконец, самый последний уровень — исследование внутриклеточных взаимодействий и процессов: контактов между белками и нуклеиновыми кислотами, трансляции и ДНК-архитектоники».

Собственно, именно последнему вопросу была посвящена новая секция конференции, и как раз там ученые ИХБФМ представили свои пионерские работы. «В России таких не было, — отмечает заведующая лабораторией структуры и функции рибосом ИХБФМ СО РАН доктор химических наук Галина Георгиевна Карпова. — Хотя методология с использованием высокопроизводительного секвенирования применительно к клеткам в мире существует около десяти лет, в РФ она не была освоена. Я говорю прежде всего о таких методах, как рибосомный профайлинг (Ribo-Seq) и аффинное сшивание между белком и молекулами РНК в живых клетках (PAR-CLIP)».

Метод, который основан на сшивании, позволяет установить для любого белка (так называемой целевой мишени) его РНК-партнера. Для чего это нужно? Несмотря на то, что геном человека расшифрован полностью, на сегодня существует множество белков, функции которых нам неизвестны. Использование вышеуказанного метода позволяет установить, в каких клеточных событиях участвует изучаемый белок. Но вначале необходимо создать специальную ДНК-конструкцию, с помощью которой функционально активный целевой белок мог бы синтезироваться в клетках в достаточных количествах, а затем к клеткам, продуцирующим этот белок, добавить фотоактивируемый аналог нуклеозида. При транскрипции (переносе информации с ДНК на РНК) последний встраивается во все синтезируемые в клетках РНК, затем клетки облучают, и происходит сшивка молекул РНК с теми белками, которые с ними взаимодействуют. Целевой белок, ковалентно связанный с РНК, выделяют с помощью специфических антител. Далее на основе этих РНК создают ДНК-библиотеки, которые затем секвенируют на высокопроизводительных платформах. В итоге получается крупный массив данных, к его обработке подключаются биоинформатики. В конечном результате становится понятно, РНК каких генов участвовали во взаимодействии с целевым белком. По словам исследователей, эта технология больше подходит для фундаментальных исследований, потому что ее удобнее использовать в культуре клеток.



«Как я уже говорила, в России это пока единственная работа такого рода, — говорит Галина Карпова. — Она опубликована сотрудниками нашего института, без участия иностранных соавторов, в высокорейтинговом журнале *Nucleic Acids Research* с импакт-фактором 10.1».

«Наша конференция длилась пять дней, и каждый из них был посвящен отдельным разделам геномики, — перечисляет Марсель Кабилов.— Секция «Медицинская геномика» — на ней обсуждались вопросы, связанные с изучением человеческих патологий как на популяционном уровне, так и на уровне транскриптомов и метиломов. Модераторами этой секции выступили О. О. Фаворова (Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва) и член-корреспондент РАН В. А. Степанов (НИИ Медицинской генетики, Томск). Ведущими секции «Палеогеномика», вызвавшей значительный интерес участников конференции, были Е. Б. Прохорчук (Центр «Биоинженерия» РАН, Москва) и А. С. Графодатский (ИМКБ СО РАН), которые являются руководителями групп, непосредственно секвенирующих древние останки человека и животных. Секцию по геномике животных, посвященную хромосомной организации геномов животных и их эволюции, провели В. А. Трифонов (ИМКБ СО РАН) и Д. М. Ларкин (University of London). Модератором секции «Геномика растений» выступил член-корреспондент РАН А. В. Кочетов (ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН). Отдельный день был выделен под геномику прокариот и вирусов, а также метагеномику. Последнее направление, весьма популярное в мире, позволяет отвечать на вопрос, какие микроорганизмы находятся в исследуемом образце (почва, воздух, горячий источник и так далее) без необходимости их культивирования в лабораторных

условиях, что на самом деле большая проблема, ведь вырастает в лучшем случае 1 % видов. А после выделения тотальной ДНК из образца и её секвенирования можно определить структуру сообщества. Обе секции провели Н. В. Равин (Центр «Биоинженерия» РАН) и Е. Е. Андронов (ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург). В настоящее время сложно представить геномику, дающую огромный массив данных, без биоинформатики, которая в том числе была представлена на секции «NGS и анализ данных» (модератор А. Л. Липидус (Санкт-Петербургский государственный университет). И совершенно новая секция для России — по изучению внутриклеточных взаимодействий с использованием высокопроизводительного секвенирования (модераторы академик А. Г. Габибов (Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва) и Г.Г. Карпова (ИХБФМ СО РАН)».

Технология рибосомного профайлинга, представленная на этой секции, также появилась за рубежом и долгое время не была поставлена в России. «Впервые в РФ ее применили наши коллеги из НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, — рассказывает Галина Карпова, — но они работали с участием иностранных ученых, за рубежом были получены и секвенированы библиотеки ДНК. Мы же выполняем все этапы этого трудоёмкого метода в нашем институте, сейчас к печати уже готовится статья».



В основе Ribo-Seq лежит тот факт, что внутри каждой рибосомы (один из клеточных органоидов, который осуществляет синтез белков во всех организмах) во время трансляции

находится участок матричной РНК длиной около 30 нуклеотидов. Существуют подходы, позволяющие остановить трансляцию в любой момент времени и таким образом получить как бы моментальный снимок того, что в данный момент транслируется на рибосоме. Далее идет ряд определенных процедур, включающих несколько десятков тонких операций, в результате которых выделяются фрагменты мРНК, которые были внутри рибосомы. Затем — секвенирование ДНК-библиотек, созданных на основе этих фрагментов, и биоинформатический анализ. «Этот метод особенно привлекателен при изучении действия на клетки новых лекарств, вирусных инфекций, ядов или неблагоприятной окружающей среды — можно узнать, как изменяется экспрессия генов на уровне трансляции в ответ на эти воздействия, — рассказывает Галина Карпова. — Особенно интересно, если в результате воздействия начинает транслироваться такая мРНК, которая в нормальных условиях не транслируется, — допустим, при вирусной инфекции синтезируется некий белок, потенциальная мишень, на которую могут быть направлены лекарственные препараты». Есть у рибосомного профайлинга и чисто фундаментальные цели: например, некоторые белки являются регуляторными, и, выключая гены, их кодирующие, или наоборот, повышая уровень этих белков, можно смотреть, как изменяется трансляция мРНК в клетках. Однако, как подчеркивает Галина Карпова, главная прикладная цель — медицина, здесь методу пророчат большое будущее.

«Следует отметить, что информация, которую может дать анализ транскриптома, не отражает реальную ситуацию на уровне протеома. Масс-спектрометрические подходы, которые потенциально могут детектировать все белки, синтезируемые в клетке, сталкиваются с огромными проблемами в случае эукариотических организмов. Выходом становится метод Ribo-Seq, который, обеспечивая информацию о транслируемых мРНК, тем самым позволяет судить на количественном уровне о белках, нарабатываемых в клетках», — добавляет Марсель Кабилов.

«Комплексное использование технологий, основанных на высокопроизводительном секвенировании, дает возможность получать результаты, которые позволяют по-новому взглянуть на молекулярную биологию клетки на разных уровнях: геномном (ДНК), транскриптомном (РНК) и транслятомном (белки). И это фантастика!» — говорит Дмитрий Пышный.

«Наука в Сибири»

Фото предоставлены Марселем Кабиловым