

Деконструкция генома

Е. Клещенко

Он встал, снял халат, ермолку, туфли. Снял полотняные штаны и рубашку. Снял, как парик, голову, снял ключицы, как ремни, снял грудную клетку, как кольчугу. Снял бедра, снял ноги, снял и бросил руки, как рукавицы, в угол. То, что оставалось от него, постепенно рассеялось, едва окрасив воздух. (...) Цинциннат, тебя освежило преступное твое упражнение.

Владимир Набоков. Приглашение на казнь

Тот, кто умеет удивлять

Крейг Вентер — одна из самых колоритных персон в современной науке о живом. Он родился в 1946 году и не слишком интересовался академическим знанием, пока не побывал во Вьетнаме, где работал в полевом госпитале. Военный опыт побудил его серьезно заняться медициной, затем он понял, что биология привлекает его сильнее, и уже в 1975 году получил докторскую степень. Настоящей знаменитостью Крейг Вентер стал, когда созданная им компания «Celera Genomics» пообещала расшифровать геном человека быстрее и дешевле, чем международный проект, поставивший ту же цель. И «Celera» сделала это: точность расшифровки у них была ниже, чем у «Генома человека», но и стоимость вышла относительно низкой: около 300 миллионов против 3 миллиардов долларов.

Не обошлось без конфликтов: большинство ученых считало, что доступ к геному человека должен быть свободным и бесплатным, а Крейг Вентер собирался предоставлять

дополнительные данные, полученные «Celera», по платной подписке, чтобы окупить затраты компании. Многие сочли это аморальным, Вентера упрекали за корыстолюбие и бесчеловечность. Однако в 2002 году он покинул пост президента компании из-за разногласий с главным инвестором — по собственным словам Вентера, предпринимательство для него было лишь источником финансирования научных проектов. В середине 2000-х на свет появился Институт Джона Крейга Вентера (JCVI) — некоммерческая организация, занимающаяся геномными исследованиями.

В 2007 году сотрудники JCVI с соавторами из других стран опубликовали статью, в которой объявили о начале эры индивидуальной геномики, а приложением к ней был собственный геном Джона Крейга Вентера, доступный любому желающему («PLoS Biology», 2007, 5(10): e266. doi:10.1371/journal.pbio.0050266). Полученные до того геномы человека были составлены из участков ДНК многих доноров, по большей части анонимных. С тех пор редко какая статья о Вентере обходится без упоминания о том, что у него имеются гены предрасположенности к асоциальному поведению. Подробнее о геномных проектах Крейга Вентера можно прочитать в его книге «Расшифрованная жизнь. Мой геном, моя жизнь» (М.: «Бином. Лаборатория знаний», 2015).

Другой проект Крейга Вентера — широкомасштабное исследование геномов морских микроорганизмов, которое должно приблизить нас к пониманию фундаментальных закономерностей экологии моря, в частности преобразований углерода. Кроме того, у морских организмов можно найти полезные гены для нужд науки и биотехнологий. В 2005 году Крейг Вентер стал одним из основателей компании «Synthetic

Genomics», которая работает над получением бактерий, дрожжей и водорослей, способных производить биотопливо — этанол и водород. Среди партнеров «Synthetic Genomics» — корпорации «Exxon Mobil» и «British Petroleum», ныне «BP plc» (ну вдруг у этих биологов получится?).

Но чтобы создать организм с нужными свойствами — бактерию ли, производящую биодизель, или что-то еще более амбициозное, — надо понимать, как устроена жизнь. Чтобы писать программы на том языке, который используется в ДНК, надо этот язык выучить. Нам уже недостаточно знать, какие последовательности ДНК запускают и прерывают синтез РНК и какому триплету какая аминокислота соответствует, — нам надо знать, какое место занимает продукт гена в жизни клетки, какие ее свойства обеспечивает, с какими другими продуктами функционально связан и т. д. А если учебников по языку программирования нет под рукой, но очень хочется? Тогда остается неправильный подход: написать небольшую программку самому, где понимаешь, как надо делать, — использовать понимание, где не понимаешь, — утащить фрагменты чужих программ (их-то хватает — расшифрованных геномов все больше), затем запустить и посмотреть, что получится. Примерно этим Крейг Вентер с коллегами занимается как минимум 20 лет.

Рождение Синтии

В 1996 году группа сотрудников TIGR (The Institute for Genomic Research, созданный Вентером в 1992-м, впоследствии стал частью JCVI) секвенировала геном *Mycoplasma genitalium*. Эта бактерия обитает в половых и дыхательных системах приматов, и геном ее — один из самых коротких, всего полмиллиона пар оснований и полтысячи генов. Понятно, паразит питается за счет чужих ресурсов, обитает в стабильных условиях и может обойтись без многого, что нужно независимым существам.

Как разобраться, зачем нужен тот или иной ген из пятисот и нужен ли вообще? Классический способ биологов — портить их и смотреть, как живет бактерия без данного гена, что для нее изменилось. Для этого в Институте Вентера разработали метод транспозонного мутагенеза: мобильные генетические элементы встраивались в геномы бактерий случайным образом, затем бактерий высевали на питательную среду и читали геномы выживших, начиная от этого элемента, чтобы выяснить, куда попала «опечатка». Можно также сравнивать геном «вашей» бактерии с геномами других организмов, исходя из предположения, что сходные гены кодируют белки со сходными функциями. А когда мы узнаем достаточно много — попытайтесь создать геном «с нуля».

Принципиальная особенность идеи Крейга Вентера была в том, чтобы и ДНК получить синтетическую, а не брать готовую, например копируя и сшивая вместе фрагменты чужого генома. Задача была, мягко говоря, непростой. Синтезировать в пробирке можно только небольшие фрагменты ДНК: длинные молекулы рвутся, если их не оберегает клеточная машинерия, привычная к обращению с хрупким носителем информации. Поэтому фрагменты клонировали в клетках кишечной палочки и соединяли, пока не получили четыре больших фрагмента, каждый примерно по четверти генома *M. genitalium*, а те уже собрали в дрожжевых клетках. (Это очень короткий рассказ без технических подробностей.)

В январе 2008 года Институт Крейга Вентера объявил о том, что геном микоплазмы полностью синтезирован. Полученной ДНК дали название *Mycoplasma genitalium* JCVI-1.0.

Следующим шагом должен был стать перенос синтетического генома в клетку микоплазмы, из которой удален ее собственный геном. Но дело не пошло: ДНК, клонированная в дрожжах, отказывалась руководить живой клеткой, хотя геном, извлеченный из клетки микоплазмы одного вида,



прекрасно приживался в другой. Ученые предположили, что причина в метилировании — выборочном присоединении CH_3 -групп к нуклеотидам, которое не меняет последовательность «букв» генома, но регулирует активность генов. Дрожжевая клетка не смогла обеспечить правильного рисунка метилирования, так что перезапуск программы не удался. Пришлось получать ферменты микоплазмы, отвечающие за метилирование, и обрабатывать ими хромосомы, извлеченные из дрожжевых клеток.

В 2009 году вышла статья в «Science» (2009, 325, 5948, 1693—1696, doi: 10.1126/science.1173759) — команда Вентера клонировала целый геном *Mycoplasma mycoides* в дрожжах и затем поместила его в клетку близкородственного вида — *M. capricolum*. Это была еще не синтетическая ДНК, но в дрожжевой клетке геном подвергся модификациям, так что создание нового жизнеспособного штамма *M. mycoides* Крейг Вентер мог записать себе в актив.

Наконец, в 2010 году поставленная задача была решена в полном объеме: синтетический геном *M. mycoides* прижился в клетке *M. capricolum* («Science», 2010, 329, 5987, 52—56, doi: 10.1126/science.1190719). Новая бактерия получила имя *Mycoplasma laboratorium* JCVI-syn1.0, а неформально ее называли Синтией (от «синтетический»).

Свое создание учение поместили — ввели в геном последовательности, которых не было у *M. mycoides*, несущие зашифрованные послания тому, кто поймает искусственную микоплазму (хотя едва ли она способна сбежать в дикую природу) и прочтет ее геном. В этих посланиях каждый из нуклеотидных триплетов обозначал букву латинского алфавита или цифру. Среди «водяных знаков» в геноме Синтии — html-скрипт, который в браузере читается как поздравление расшифровщику, перечень авторов статьи, а также цитаты из Джеймса Джойса («Жить, заблуждаться, падать, торжествовать, воссоздавать жизнь из жизни»), Роберта Оппенгеймера («Видеть не то, что есть, а то, что может быть») и Ричарда Фейнмана («То, чего я не могу построить, я не могу понять»; хотя, точности ради, у Фейнмана было «создать»).

Наследники Джойса выразили недовольство, что Вентер и компания не поставили их в известность и не спросили разрешения, прежде чем вставить бессмертную строчку в бактерию. До судебных разбирательств дело не дошло (хотя «испорченный телефон» Интернета предлагает и такую версию событий), так что микоплазма продолжает несанкционированное копирование классического текста. Интересно было бы взглянуть, не испортили ли его мутации, не превратилось ли, например, «жить» в «пить»...

Только необходимое

Цитаты, как видим, были подобраны со смыслом, но всегда ли мы можем понять, то, что построили? Как писал философ Дэниэл Деннетт из университета Тафтса: «Когда переходил от попыток моделировать вещи с помощью уравнений к производству совершенных компьютерных моделей... ты можешь

закончить моделью, тонко моделирующей природу, но ты не понимаешь модель». Это можно отнести и к работе Вентера с коллегами: точная копия генома микоплазмы не намного понятнее, чем сам геном микоплазмы. Да, эксперимент доказал, что мы ничего не упустили, — ДНК генома достаточно, чтобы передать по наследству все важные свойства и поддерживать жизнь клетки. Но теперь пришло время следующего шага — удалить все ненужное или не очень нужное, создав минимальный геном.

Представление о «коровом» (сердцевинном) наборе генов, необходимом для выживания клетки, возникло давно. Его, в частности, сформулировали Аркадий Мушегян и Евгений Кунин еще в 1996 году. Они сравнивали геномы *M. genitalium* и *Haemophilus influenza* — кстати, и тот, и другой секвенировала команда Вентера — и получили, что такой набор должен включать 256 генов («Proceedings of the National Academy of Sciences USA», 1996, 93, 10268—10273). А над этим базисом различные виды создают свои надстройки, которые дают им всяческие преимущества, большие и малые, но для жизни и размножения в идеальных условиях они необязательны.

В науке есть много теоретических существ: одни, вроде демона Максвелла, обитают лишь в воображении ученых, другие, как Последний Общий Предок всех живых клеток, были на самом деле, но настолько далеки во времени, что облик их туманен. Вентер с соавторами воплотили в реальность один из экспонатов умозрительного bestiaria — Клетку С Минимальным Геномом. Или, по крайней мере, рабочее приближение к этому идеалу.

Были и другие проекты со сходными задачами: например, у кишечной палочки удаляли гены один за другим, существенно уменьшая размер ее генома. Но авторы статьи подчеркивают, что они начали снизу, а не сверху: синтезировали «из ничего» минимальный геном и посмотрели, сможет ли он функционировать. Сами они называют то, что делают, — «полногеномный дизайн».

Синтетическая жизнь, версия 3.0

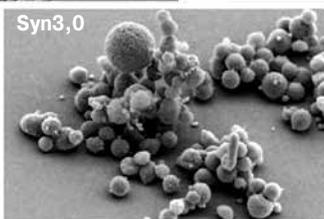
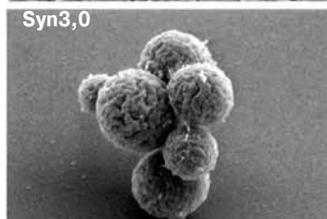
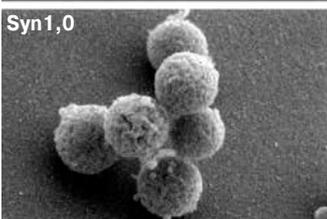
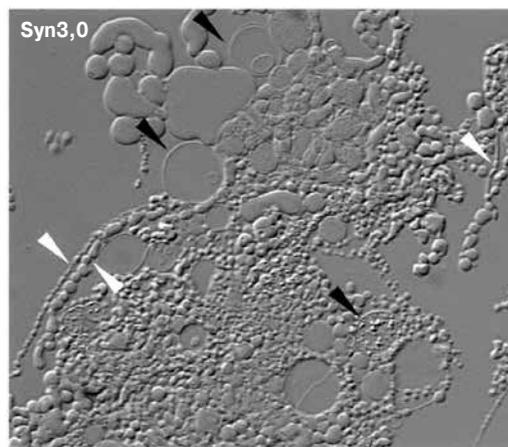
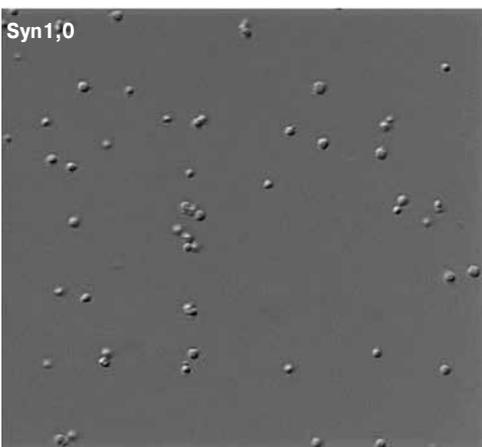
Успех пришел не сразу. Гипотетический минимальный геном (HMG) построили по ранее имеющимся данным о генах микоплазмы, о том, какие из них нужны, а какие не особенно или не нужны вовсе. Гены удаляли из генома *M. laboratorium* JCVI-syn1.0 — геном *M. genitalium* меньше, но *genitalium* медленно растёт, к тому же syn1.0 — свое, родное животное, капризы

которого хорошо знакомы его создателям. Пришлось разработать определенные «правила синтаксиса» при удалении, с тем, чтобы оно не повлияло на нужные гены: вспомним, например, что у бактерий последовательности генов часто перекрываются и, удалив один, можно обрезать другой. Геном синтезировали, как и при создании syn1.0, путем последовательной сборки фрагментов. На заключительном этапе получили восемь сегментов, перекрывающихся краями.

В начале 90-х годов студенты биофака МГУ передавали друг другу тетрадки с рукописным переводом «Властелина колец». (Литература в жанре фэнтези еще не стала индустрией, персональные компьютеры были у единиц — нашим детям этого не понять.) Одна из тетрадок потерялась, и на обложке предыдущей было написано ее краткое содержание: «Фродо, Сэм и Горлум идут через страшные ужасные болота, где все, особенно Фродо, чуть не утонули, потом они встречают брата Боромира, который, однако, на него совсем не похож...» Слабая замена полному тексту, но все-таки можно читать дальше. Примерно так же Вентер и соавторы проверяли на осмысленность каждый из восьми сегментов. Они создали восемь тестовых комбинаций: в каждой один сегмент был из HMG, остальные семь — из syn1.0. Семь полных тетрадок и одно краткое содержание. Читательской оказалась лишь одна комбинация, где на минимальный был заменен фрагмент номер 2, все остальные варианты вышли нежизнеспособными. Стало понятно, что какие-то гены напрасно посчитали ненужными.

Первый этап был по-своему полезным: например, удалось повысить точность синтеза ДНК и увеличить скорость сборки генома — теперь она занимала менее трех недель, а не месяцы и годы. Но как определить, какие слова надо вернуть в текст, чтобы он читался?

Геномные дизайнеры снова использовали транспозонный мутагенез: подвергли ему syn1.0, получили колонии выживших бактерий и исследовали их геномы. Если ген разорван встройкой транспозона, а бактерия все еще жива, значит, этот ген не нужен. Таких встроек (инсерций) было найдено 30000. Затем клетки пересевали более 40 раз и смотрели, какие мутации сохранятся после пересевов, — «больные» клетки, растущие медленно, при этом исчезали. В новом поколении мутаций было гораздо меньше — около 14000. Можно было предположить, что те 16000 мутаций, которые исчезли при пересевах, повреждали гены, без которых жить можно, хотя бы плохо, а те, которые остались, — попали в гены, которые действительно не нужны.



После этого ученые поделили гены syn1.0 на три группы: необходимые (essential, e-гены), ненужные (nonessential, n-гены) и квазиобязательные, вызывающие совместимые с жизнью повреждения (impairment — i-гены, те самые, что были повреждены мутациями, исчезнувшими при пересевах). Последние, в свою

Синтия Первая и Синтия Третья: общий вид в жидкой культуре и «портреты» отдельных клеток. Хорошо видны нитевидные структуры, которые образует syn3.0. Впрочем, они легко разрушаются при взбалтывании

Геномы разных биологических видов

Вид	Размер генома	Число генов
Человек	3,2 млрд п. н.	около 20 тыс.
Растение <i>Arabidopsis thaliana</i>	157 млн п. н.	более 25 тыс.
Нематода <i>Caenorhabditis elegans</i>	100 млн п. н.	более 20 тыс.
Плодовая мушка <i>Drosophila melanogaster</i>	175 млн п. н.	более 13 тыс.
Кишечная палочка <i>Escherichia coli</i>	4,6 млн п. н.	4288
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0,58 млн п. н.	525
<i>Mycoplasma mycoides</i>	1,20 млн п. н.	около 1 тыс.
<i>Mycoplasma laboratorium</i> JCVI-syn1.0	1 078 809 п. н.	901
<i>Mycoplasma laboratorium</i> JCVI-syn3.0	531 000 п. н.	473 гена (кодируют 438 белков и 35 РНК)

очередь, поделили на более и менее необходимые, в зависимости от того, насколько сильно замедлялся без них рост.

На основании этих данных построили новый вариант минимального генома, который назвали RGD1.0 (от reduced genome design). Он был вдвое короче генома syn1.0, из него удалили почти все п-гены (кроме тех, которые находились между обширными кластерами нужных генов, и тех, чьи биохимические функции представлялись важными вопреки данным по мутагенезу). Потом опять синтезировали восемь сегментов, скомбинировали каждый с семью фрагментами syn1.0. Теперь все восемь комбинаций оказались жизнеспособными. Правда, одна, с сокращенным сегментом 6, росла очень медленно: как выяснилось, в ней оказались незапланированные повреждения. После исправления дефекта все наладилось.

Осталось собрать сокращенный геном из восьми фрагментов... ага, как же! Комбинация восьми сокращенных фрагментов снова была нежизнеспособной. Такое вполне могло случиться. Представим, что ферменты А и В оба осуществляют одну и ту же реакцию, при этом А находится в сегменте 1, а В — в сегменте 3. Фермент А может быть поврежден без ущерба для жизни, если сохранен В, и наоборот, таким образом, А и В будут казаться ненужными и в экспериментах по мутагенезу, и при сборке геномов с фрагментами syn1.0. А вот на финальном этапе вылезет ошибка: необходимая реакция в клетке не пойдет.

Тогда ученые создали наборы разнообразных комбинаций сегментов RGD1.0 и syn1.0. Жизнеспособной оказалась версия с сегментами 2, 6, 7 и 8 от RGD1.0 и 1, 3, 4, 5 — от syn1.0. Причем весьма жизнеспособной — число клеток удваивалось за 105 минут, а у syn1.0 — примерно за час. Теперь уже эту конструкцию подвергли транспозонному мутагенезу и выяснили, какие якобы ненужные гены в сегментах 1, 3, 4, 5 нельзя было трогать, потому что в новом контексте они перешли в категорию необходимых или квази необходимых. Синтезировали эти сегменты заново — и наконец-то получили живую клетку, которую назвали JCVI-syn2.0 (длина генома — 576 пар оснований, 478 генов белков и 38 генов РНК). На последнем этапе они смогли удалить еще 42 гена и наконец получить JCVI-syn3.0 с геномом меньше, чем у *M. genitalium* («Science», 2016, 351, 6280, aad6253. doi: 10.1126/science.aad6253.).

Когда эту «почти минимальную» конструкцию еще раз подвергли мутагенезу, встройки наблюдались главным образом в межгенных последовательностях, иногда — в генах, условно необходимых. Геном Синтии Третьей состоял в основном из генов, которые в первых опытах были отнесены к e- и i-группам.

Что это за гены? Удалены были в первую очередь вставки мобильных элементов, гены модификации и рестрикции ДНК. Поскольку клетки росли на богатой среде, оказалось возможным также удалить некоторые гены, отвечающие за



ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

метаболические процессы. (Например, глюкозы в среде много, значит, умение использовать альтернативные источники углерода не так уж и нужно.) С другой стороны, желательнее оставить то, что обеспечивает копирование и считывание генетической информации, деление клетки, формирование трехмерной структуры белков, клеточный метаболизм, а также функционирование мембранных структур, — даже находясь в самой благоприятной среде, надо уметь всасывать питательные вещества и поддерживать гомеостаз.

Однако 79 генов все-таки не удалось включить ни в одну из этих категорий, и по крайней мере 19 среди них — e-гены. Авторы статьи оптимистично предположили, что это самое интересное: может быть, неизвестные гены обеспечивают неизвестную, но, очевидно, очень важную биологическую функцию.

Как выглядит и что умеет

Сокращенная версия медленнее реплицируется, чем syn1.0 (время удвоения — около трех часов). В остальном обе Синтии похожи друг на друга и на свою прародительницу *M. mycoides*. Но интересно, что в отличие от первой версии третья склонна образовывать агрегаты в жидкой культуре, правда, легко разрушающиеся.

Некоторые пионеры синтетической биологии, например Джордж Черч, высказывались о бактерии Крейга Вентера скептически: очень сложно, очень дорого и в конечном счете не делает ничего такого, чего не могла бы делать старая добрая кишечная палочка. Однако Венгер и соавторы наметили несколько возможных применений Синтий.

Для начала они решили проверить, что произойдет, если расположить гены в геноме не так, как в геноме «дикой» микоплазмы, а в соответствии с логикой — если функционально связанные гены поставить рядом. (Кстати, у бактерий и в природе часто так бывает: рядом располагаются, например, гены, продукты которых обеспечивают последовательные превращения одного вещества.) Подобная реорганизация сегмента 2 у syn1.0 как минимум не замедлила ее роста. А еще исследователи вставили в геном syn3.0 слегка измененный ген 16S РНК рибосомы — то есть подправили одну из деталей машины, синтезирующей белки! И это прошло благополучно. Возможно, такие тонкие эксперименты удобнее ставить в полностью контролируемой среде.

Итак, у нас есть живая клетка в базовой конфигурации или нечто весьма близкое к ней. Научимся ли мы усложнять программу, дописывать новые функции, конструируя бактерию, способную превращать куски полиэтилена и картофельные очистки в высокооктановый бензин? Или другую — сырье пускай то же самое, но в глюкозу? И заодно третью, которая производит органику из метана, углекислого газа и азота под действием солнечного света, специально для нужд терраформирования далеких планет... По сравнению с тем, что уже сделано, невозможным все это не кажется.

