

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Хромов Андрей Владимирович

**Бесплазмидное редактирование генома растений картофеля системой
CRISPR/Cas9**

03.01.03 - молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в отделе биохимии вирусов растений Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель

Калинина Наталья Олеговна,
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты

Чирков Сергей Николаевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Соловьев Александр Александрович, доктор биологических наук, заместитель директора по научной и образовательной деятельности ФГБПУ ВНИИСБ, заведующий лабораторией маркерной и геномной селекции растений, профессор РАН

Эльдаров Михаил Анатольевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы генетической инженерии грибов ФГБУН ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт Биоинженерии

Защита диссертации состоится «19» ноября 2020 года в _____ на заседании диссертационного совета МГУ.03.01 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. 389.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/322262828/>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

Введение

Актуальность темы исследования.

Известно, что вирусные инфекции являются причиной почти половины всех эпифитотий сельскохозяйственных культур. В настоящее время новые технологии редактирования генома открывают широкие возможности для генерации растений, устойчивых к различным инфекциям. Новейшей и самой передовой технологией редактирования генов, которая может быть использована для достижения этой цели, является технология CRISPR/Cas. Эта технология уже произвела революцию в различных областях наук о жизни, в частности в медицине и биотехнологии, и предлагает новый, мощный альтернативный (или дополнительный) подход к классической селекции растений для улучшения их характеристик. Учитывая, что вирусы растений могут вызывать огромные потери урожайности сельскохозяйственных культур, неудивительно, что в последние годы проявился интерес к использованию различных аспектов технологий CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к вирусным патогенам.

Степень разработанности темы.

Для достижения этой цели системы CRISPR/Cas можно использовать двумя основными способами: (1) путем прямого нацеливания на вирусные геномы и (2) путем внесения целевых мутаций в конкретные гены растений-хозяев, белки, кодируемые которыми, используются вирусом для успешной репликации и распространения в растении. Первый способ используется в настоящее время большинством исследователей. Практическое применение технологии CRISPR/Cas сталкивается с рядом «узких» мест, решение которых имеет принципиальное значение для редактирования генов растений, одним из которых является метод доставки компонентов редактирующего комплекса Cas9/короткая геновая РНК в растения. Доставка генов с использованием плазмидной ДНК и агробактериальной трансформации (основной применяемый метод) приводит к получению трансгенных растений, использование которых запрещено законодательством многих стран. Предпочтительными являются методы прямой (бесплазмидной) доставки кРНК и белка Cas9, которые активно разрабатываются в последнее время.

Цели и задачи исследования:

Целью настоящей работы является получение отредактированных линий картофеля, устойчивых к вирусной инфекции, с помощью технологии CRISPR/Cas с применением бесплазмидного способа доставки редактирующего комплекса.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать способ доставки в клетки растений *Nicotiana benthamiana* и *Solanum tuberosum* платформ на основе микрочастиц хитозана с иммобилизованными на их поверхности флуоресцентно мечеными модельными белками и короткими РНК методом инфльтрации в клетки растений.
2. Отработать условия доставки редактирующего комплекса (рекомбинантная эндонуклеаза Cas:кРНК) в клетки меристем растений картофеля *S.tuberosum* с использованием платформ на основе микрочастиц хитозана и микрочастиц золота.
3. С использованием бесплазмидных технологий доставки редактирующих компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки меристем растений картофеля провести редактирование двух генов – гена *PDS* и гена коилина.
4. Провести функциональный анализ гена коилина в устойчивости отредактированных линий растений картофеля к инфекции Y вирусом картофеля (YBK) и абиотическим стрессам.

Научная новизна работы

Предложен новый метод доставки редактирующего комплекса в клетки растений с использованием микрочастиц хитозана и метода вакуумной инфльтрации, защищенный патентом. В качестве клеток/тканей впервые использованы апикальные меристемы картофеля, ключевым преимуществом которой является простота их дальнейшей регенерации в целые растения, что широко используется в производстве безвирусного картофеля. С использованием бесплазмидных технологий доставки редактирующих компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки меристем растений картофеля проведено редактирование модельного гена – гена фитоеен десатуразы и гена коилина, угнетение экспрессии которого по литературным данным, повышает устойчивость растений *N. benthamiana* к инфекции YBK и абиотическим стрессам. Впервые показано, что геномное редактирование клеток меристем приводит к появлению протяженных делеций (от 400 до 600 пн) в редактируемых генах. Редактированные по гену коилина линии растений картофеля демонстрировали повышенную устойчивость к инфекции YBK и абиотическим (солевому и осмотическому) стрессам. Редактированные растения с использованием технологии CRISPR/Cas, не относящиеся к ГМО, получены в нашей стране впервые.

Научная и практическая значимость

Новый метод доставки редактирующего комплекса в клетки меристем растений с использованием микрочастиц хитозана и метода вакуумной инфльтрации перспективен для создания отредактированных линий растений различных видов, не относящихся к ГМО. Ген коилина представляет собой перспективную мишень для получения линий и сортов сельскохозяйственных растений (прежде всего картофеля), устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам.

Личный вклад автора.

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных экспериментальных данных. Автор принимал участие в подготовке статей к публикации и представлял результаты исследований на конференциях.

Методология и методы исследования.

Исследования выполнены с использованием современных методов генной инженерии молекулярной биологии и вирусологии. Доставка редактирующего комплекса (рекомбинантная эндонуклеаза:кгРНК) в клетки меристем растений картофеля *S.tuberosum* проводили путем бомбардмента или вакуумной инфльтрации с использованием в качестве платформ микрочастиц золота и микрочастиц хитозана. Дизайн коротких гидовых РНК осуществляли с использованием современных сервисов, для последующего синтеза кгРНК использовали клонирование и транскрипцию *in vitro*. Уровень экспрессии отредактированных генов растений оценивали методом ОТ-ПЦТ и ПЦР-РВ. Факт редактирования гена оценивали методами фрагментного анализа, генотипированием и методом глубокого секвенирования (NGS) фрагмента редактируемых последовательностей. Оценка устойчивости отредактированных растений к вирусной инфекции проводили с использованием метода ИФА и ПЦР-РВ. Работа выполнена с использованием современного оборудования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Дизайн коротких гидовых РНК (кгРНК) к консервативным участкам генов фитоеен десатуразы и коилина растений картофеля *Solanum tuberosum*L. и оценка *in vitro* эффективности синтезированных кгРНК в разрезании целевого участка генов

рекомбинантной эндонуклеазой Cas9 позволяет отобрать активные кгРНК для последующего редактирования генов.

2. Способ доставки в клетки растений *N. benthamiana* и *S. tuberosum* платформ на основе микрочастиц хитозана с иммобилизованными на их поверхности флуоресцентно меченными модельными белками и короткими РНК с помощью инфильтрации комплексов в листья растений позволяет эффективно доставлять биомолекулы в клетки эпидермиса.

3. С использованием бесплазмидных технологий для доставки редактирующих компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки растений картофеля проведено редактирование двух генов – гена PDS и гена коилина.

4. Редактирование генов в клетках меристемы картофеля сопровождается образованием протяженных делеций.

5. Редактированные по гену коилина линии растений-регенерантов картофеля характеризуются повышенной устойчивостью к заражению Y-вирусом картофеля (YBK, род *Potyvirus*) и к абиотическим осмотическому и солевому стрессам в опытах *in vitro* и *in vivo* и полевых условиях.

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность результатов подтверждается их воспроизводимостью в повторных экспериментах, наличием положительных и отрицательных контролей. По теме диссертационной работы было опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus, PubMed) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 – молекулярная биология и получен 1 патент. Результаты работы были представлены на международной конференции CRISPR 2018, Новосибирск, Россия; международной научной конференции "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды", Москва, Россия, 2017; 42-43 конгрессах Федерации европейских биохимических обществ (Иерусалим, Израиль, 2017; Прага, Чехия, 2018).

Структура и объем диссертации.

Материалы диссертации изложены на 91 странице машинописного текста и включают 28 рисунков и 4 таблицы. Диссертация состоит из разделов: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы (последний раздел содержит 177 источников).

Результаты и обсуждение

1. Конструирование коротких гидовых РНК для редактирования генома картофеля с использованием системы CRISPR/Cas9

Технология CRISPR/Cas9 обеспечивает эффективную и точную модификацию генома, вызывая целевые разрывы ДНК, которые активируют клеточные механизмы репарации клеточной ДНК по механизмам негомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологичной репарации (HDR). Ключевую роль в успешном создании приложений на основе этой технологии является рациональный дизайн коротких гидовых РНК (кгРНК). Обычно дизайн потенциально возможных кгРНК осуществляется с помощью биоинформатических сервисов (<https://crispr.mit.edu/>). Однако на практике далеко не все из предсказанных кгРНК обладают высокой активностью. Таким образом, подбор кгРНК

к уникальной последовательности в геноме играет важное значение и зависит от пока не до конца понятных факторов. Кроме того, при подборе кГРНК следует исключить возможность нецелевого редактирования генома (off-target эффект), которая может являться следствием взаимодействия кГРНК с другими нуклеотидными последовательностями в геноме данного вида, имеющими некоторую гомологию с целевой последовательностью.

Нами был проведен анализ особенностей функциональной активности кГРНК в контексте внесения разрывов эндонуклеазой Cas9 в различные участки ДНК двух генов картофеля: гена фитоеен десатуразы (phytoene desaturase, ген *PDS*) и гена основного структурного белка субъядерных телец Кахалия - коилина. Поскольку ключевыми параметрами для дизайна кГРНК являются положение РАМ-сайта, комплементарность спейсерной последовательности кГРНК протоспейсеру и возможность спаривания с нецелевыми участками ДНК в геноме, проведен сравнительный анализ активности молекул кГРНК, сконструированных для внесения разрывов в различные участки генов фитоеен десатуразы и коилина картофеля. Кроме того, исследовано влияние неспаренных оснований в составе кГРНК и изучена роль 3'-прилежащих к РАМ-сайту нуклеотидных последовательностей, вовлеченных во взаимодействия между белком Cas9 и ДНК, на активность кГРНК *in vitro*.

Для сравнения эффективности внесения разрывов в различные участки ДНК генов коилина и фитоеен десатуразы с помощью Cas9, к каждому из этих генов с помощью биоинформатического веб-сервиса (<http://crispr.mit.edu/>) было отобрано по 6 последовательностей, комплементарных потенциальному сайту редактирования, которые затем были синтезированы в виде олигонуклеотидов, клонированы в экспрессионные генно-инженерные конструкции, содержащие остальные необходимые элементы кГРНК и накоплены с помощью *in vitro* транскрипции. Положение кГРНК относительно генов белков показано на схеме, приведенной на рис. 1.

Ген фитоеен десатуразы



Ген коилина



Рисунок 1. Схема расположения кГРНК на кодирующей последовательности генов фитоеен десатуразы и коилина. Оранжевым отмечены кГРНК, которые в дальнейшем были использованы в работе. Позиции нуклеотидов на матричной цепи ДНК соответствуют приведенным в базе данных (*PDS* - идентификационный номер NW_006238964, *Coilin* - NW_006239172, GenBank)

Активность синтезированных кГРНК определялась *in vitro* согласно стандартной методике (Larson et al., 2013) с использованием генно-инженерных конструкций, содержащих вставки фрагментов генов фитоеен десатуразы и коилина картофеля, к которым были подобраны кГРНК. Эти конструкции были линейаризованы с помощью рестриктаз и обрабатывались комплексом рекомбинантного белка Cas9 и

синтезированных кгРНК, а результат реакции фиксировался методом электрофореза в агарозном геле. Оказалось, что 5 из 6 кгРНК для гена фитоен десатуразы были активны и могли *in vitro* эффективно направлять Cas9 для расщепления целевого участка ДНК, в то время как в случае коилина проявляла активность только одна из пяти кгРНК. На рис. 2 представлен результат фрагментного анализа для шести кгРНК фитоен десатуразы и единственной активной кгРНК для гена коилина - кгРНК3. Размеры получившихся после разрезания фрагментов соответствовали ожидаемым, что указывало на специфичность разрезания целевой ДНК. Специфический характер разрезания также был подтвержден с помощью сэнгеровского секвенирования образовавшихся фрагментов (данные не показаны). Интересно, что наши попытки синтезировать активную кгРНК к области гена, кодирующего N-концевой домен коилина, не были успешными. Следует отметить, что биоинформатический анализ не выявил каких-либо закономерностей, объясняющих присутствие или отсутствие активности кгРНК в зависимости от последовательности целевого участка генома картофеля, тем самым предполагая существование и других факторов, контролирующих активность кгРНК. Одним из таких факторов может являться структура хроматина.

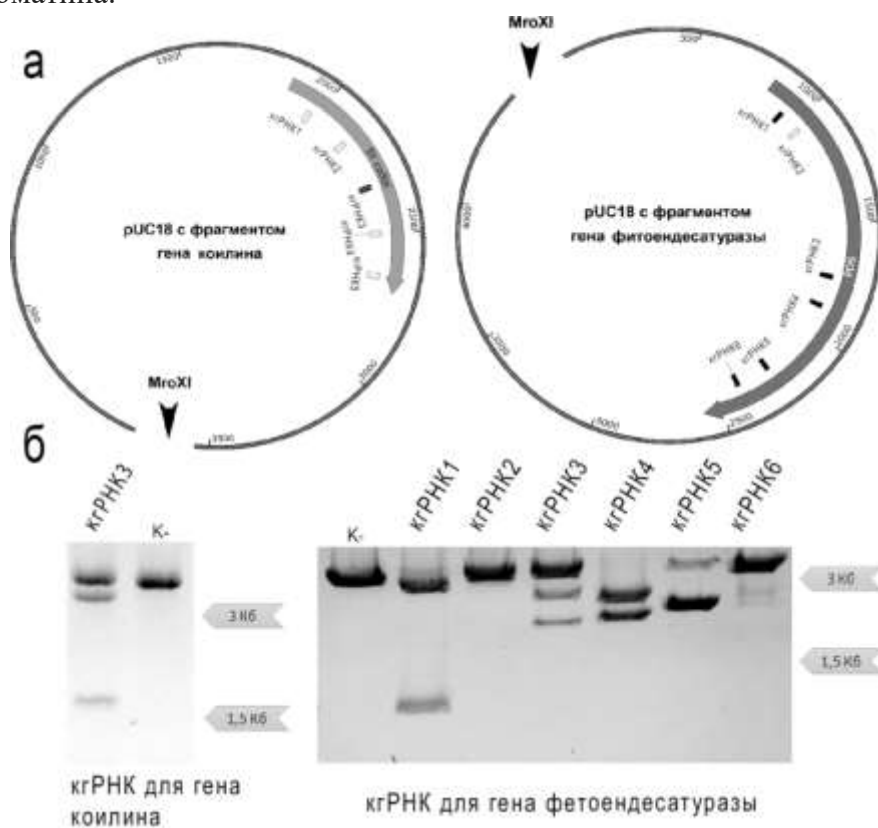


Рисунок 2. *In vitro* активность комплекса Cas9-кгРНК в отношении целевого ДНК субстрата – генов коилина и гена фитоен десатуразы *S.tuberosum*. а - Схема расположения кгРНК на целевых фрагментах генов коилина и фитоен десатуразы в составе генно-инженерных конструкций. Черными прямоугольниками отмечены активные кгРНК. Стрелками отмечены сайты линейаризации. б - Визуализация реакции разрезания с помощью фрагментного анализа в агарозном геле. В качестве отрицательного контроля использовались исходные генно-инженерные конструкции, содержащие фрагменты гена коилина и фитоен десатуразы. В случае фрагмента гена коилина приведены данные только для активной кгРНК.

Для дальнейшей работы была отобрана активная кгРНК3 для гена коилина. Поскольку она не обеспечивала полного разрезания матрицы, имелась возможность повышения эффективности ее действия в отношении разрезанию ДНК посредством оптимизации ее последовательности. В последовательность взаимодействующего с протоспейсером участка кгРНК вносились вырожденные нуклеотидные замены: на стадии синтеза олигонуклеотида по 2 нуклеотида, начиная с первого, последовательно заменялись на случайные. Активность синтезированных кгРНК *in vitro* в отношении разрезания фрагмента гена коилина оценивалась количественно методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием пары праймеров, прилежащих к участку разрезания. В случае, когда матрица была разрезана с помощью комплекса Cas9-кгРНК, реакция ПЦР блокировалась и эффективность амплификации соответствующего фрагмента снижалась. В результате эксперимента была проанализирована активность десяти различных кгРНК, содержащих вырожденные нуклеотидные замены (рис. 3). Ряд вырожденных замен (нуклеотиды: 3-4 (д2), 5-6 (д3), 15-16 (д8), 17-18 (д9) и 19-20 (д10)) приводили к падению активности. Более того замена 7 и 8 нуклеотидов (д4) приводила к полному подавлению активности соответствующей кгРНК. С другой стороны, вырожденная замена нуклеотидов 1-2 (д1), 9-10 (д5), 11-12 (д6) не оказывала влияния на активность кгРНК, а замена нуклеотидов 13-14 (д7) повышала эффективность разрезания. Данные результаты указывают, что полная комплементарность между кгРНК и целевым участком ДНК не является фактором, необходимым для внесения разрывов в ДНК нуклеазой. Более того, отсутствие полного спаривания между кгРНК и ДНК может приводить к повышению эффективности разрезания.

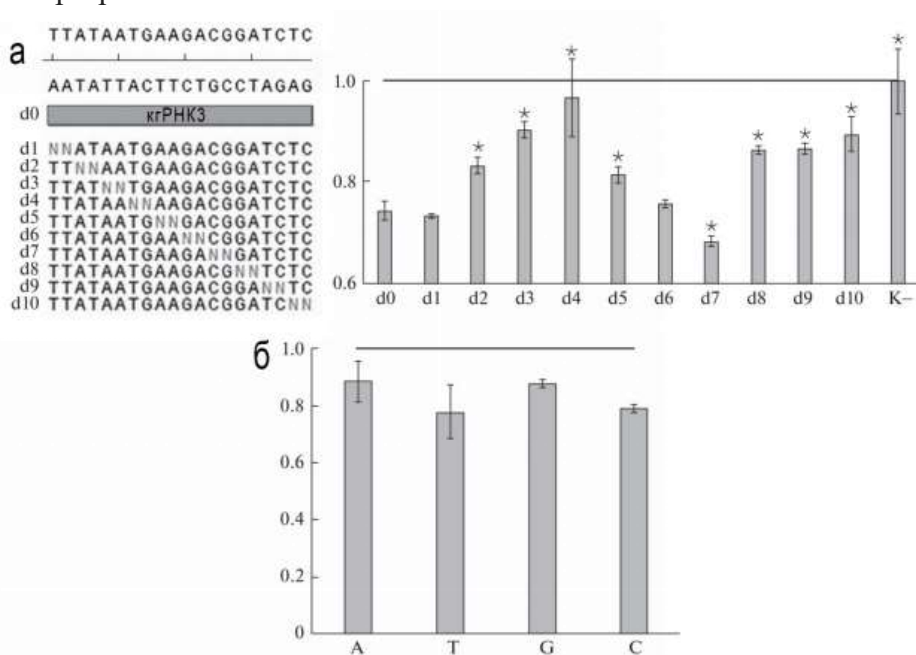


Рисунок 3. Влияние на активность Cas9-кгРНК *in vitro* вырожденных нуклеотидных замен в составе кгРНК и 3'-прилежащего к РАМ-сайту целевого участка ДНК. а - Влияние на активность кгРНК вырожденных нуклеотидных замен. Слева показана схема организации гидовых РНК, содержащих вырожденные нуклеотидные замены, справа - разрезание целевого ДНК-субстрата с помощью Cas9 и кгРНК, содержащих вырожденные нуклеотидные замены; количественная оценка проводилась с помощью ПЦР-РВ. б - Влияние на эффективность работы комплекса Cas9-кгРНК последовательности 3'-прилежащего к РАМ-сайту целевого участка ДНК. На рисунке показана активность комплекса Cas9-кгРНК в отношении ДНК субстратов, содержащих

после РАМ-сайта 6А, 6Т, 6G или 6С; количественная оценка проводилась с помощью ПЦР-РВ. Данные ПЦР-РВ были нормализованы по концентрации исходной матрицы (исходного ДНК-субстрата; черная линия) и представлены в виде отношения количества “нерасщепленной” после реакции ДНК к общему количеству ДНК, внесенной в реакционную смесь.

Анализ структуры комплекса Cas9-кРНК с целевым участком ДНК, методом рентгеноструктурного анализа (Hiranoetal. 2016), показал, что во взаимодействие с белком Cas9 вовлечены как минимум 6 нуклеотидов, следующие за РАМ-сайтом. Таким образом, было естественно предположить, что эта последовательность может являться одним из факторов, влияющих на активность комплекса Cas9-кРНК. Для экспериментальной проверки этого предположения были получены 4 мутантных варианта потенциального участка редактирования гена коилина, в которых шесть 3'-прилежащих к РАМ-сайту нуклеотидов были заменены на 6 цитозинов (мутант 6С), 6 гуанинов (мутант 6Г), 6 аденинов (мутант 6А) и 6 тиминов (мутант 6Т), соответственно. Интересно, что анализ эффективности разрезания целевых ДНК, проведенный с помощью ПЦР-РВ, не выявил статистически достоверных различий между эффективностью разрезания ДНК мишеней как дикого типа, так и всех остальных мутантных вариантов (рис. 3б). Эти данные предполагают, что хотя 6 нуклеотидов 3' проксимальных к РАМ-сайту участвуют в непосредственном взаимодействии с Cas9, их состав и последовательность заметной роли в определении специфичности этого взаимодействия не играют.

В заключение следует отметить, что данные, полученные при тестировании активности кРНК *in vitro*, не позволили выявить особенности их структуры, определяющие способность или неспособность ассоциированной с кРНК эндонуклеазы Cas9 вносить разрывы в геномную ДНК картофеля. Эти данные предполагают необходимость обязательного предварительного *in vitro* тестирования кРНК, предсказанных биоинформатически.

Также, используя вырожденные нуклеотидные замены, при которых в определенной позиции равновероятно может находиться любой из четырех нуклеотидов, было показано, что неспаренные нуклеотиды в спейсерном участке кРНК могут не только снижать, но и повышать эффективность действия комплекса Cas9-кРНК. Данное обстоятельство расширяет возможности неспецифической доставки Cas9 к частично комплементарным участкам генома, повышая риск его нецелевой модификации, и, следовательно, должно учитываться при предварительном биоинформатическом поиске целевых сайтов для геномного редактирования.

Рациональный подбор кРНК к уникальной последовательности в геноме обеспечивает высокую специфичность редактирования (Doenchetal. 2014). Известно, что наиболее значимым для проявления специфической активности кРНК является так называемый “seed” регион гидовой РНК (10-12 нуклеотидов проксимальных к РАМ-сайту) (Doenchetal. 2014), причем кРНК, имеющие низкое содержание G/C обычно существенно менее активны (Doenchetal. 2014; Doenchetal. 2016). Однако данные наблюдения справедливы только для больших выборок и не могут предсказать будет ли активной конкретная кРНК. Так, например, в случае подобранных нами кРНК не наблюдалось каких-либо закономерностей (в том числе и вышеописанных) в последовательностях активных и неактивных кРНК.

2. Разработка платформы на основе микрочастиц хитозана для бесплазмидной доставки макромолекул в клетки растений.

Хотя системы CRISPR / Cas обладают большим потенциалом в контроле вирусных инфекций и улучшении характеристик сельскохозяйственных культур, их внедрение имеет серьезное «узкое место», а именно низкую эффективность, с которой реагенты CRISPR / Cas могут быть доставлены в клетки растений (Baltes et al. 2014). Чтобы преодолеть эти ограничения, важно иметь в виду, как и в какой форме реагенты CRISPR / Cas могут быть доставлены в ткани растений для разработки соответствующих протоколов с целью обеспечения оптимального и экологически безопасного использования данной технологии.

В последние годы активно разрабатываются бесплазмидные методы для доставки белка Cas9 и кРНК в клетки растений, исключая интеграцию чужеродной ДНК в геном растения. Эти подходы включают прямую доставку в растительные клетки предварительно собранных ферментативных рибонуклеопротеидных (РНП) комплексов Cas9-кРНК путем трансфекции протопластов, и бомбардмента клеток растений функционализированными микрочастицами золота или вольфрама или наночастицами мезопористого кремнезема (Andersson et al. 2018; Svitashchev et al. 2016; Martin-Ortigoza et al. 2014; Woo et al. 2015; Lian et al. 2016). Преимущество этих технологий без использования ДНК (DNA-free) заключается в отсутствии молекулы ДНК, которая может интегрироваться в непредсказуемую область генома и отсутствие конститутивной экспрессии гена *Cas9*, что может приводить с определенной вероятностью к нецелевым эффектам. К другим преимуществам относятся быстрое редактирование генома и быстрая деградация РНП-комплекса в клетках, что также снижает вероятность нежелательных побочных эффектов (Kanchiswamy 2016; Kanchiswamy et al. 2015). Бесплазмидные методы доставки редактирующего комплекса являются перспективными и предпочтительными, также и по той причине, что они позволяют получать отредактированные растения с желаемыми свойствами, избегая ограничений, касающихся ГМО.

В качестве методов доставки в настоящей работе были применены два варианта: доставка редактирующего комплекса, иммобилизованного на микрочастицах золота, методом бомбардмента (биобиллистики) (известный и апробированный в литературе метод) и доставка редактирующего комплекса, иммобилизованного на микрочастицах хитозана, методом вакуумной инфльтрации (оригинальный метод, разработанный нами при выполнении этой работы и защищенный патентом).

В качестве реагента для создания частиц-носителей (платформ) биологических макромолекул и доставки их в растительную клетку нами был использован хитозан, который, благодаря своей поликатионной природе, способен образовывать полиэлектролитные комплексы с отрицательно заряженными полимерами, такими как нуклеиновые кислоты, белки и нуклеопротеиды (Pina and Varlamov 2005; Danielsen et al. 2004). Хитозан растворяли в Na-ацетатном буфере при pH 4,5 и к раствору добавляли водный раствор сшивающего реагента - триполифосфата натрия в весовом соотношении хитозан:ТПФ, равном 5:2. Данные условия приводили в формированию гомогенного препарата частиц хитозана с диаметром 600-800 нм (рис. 4а). К полученному раствору частиц хитозана добавляли растворы белка или РНК, меченных флуоресцентными красителями, перемешивали и озвучивали (обрабатывали ультразвуком с частотой 50/60

Hz) при температуре 25°C в течение 10 минут с использованием ультразвуковой мойки. Эффективность загрузки наноплатформ оценивалась методом флуоресцентной микроскопии, основываясь на количестве флуоресцирующих частиц по отношению к общему количеству частиц, видимых в световом поле. Параллельно регистрировали фазово-контрастное изображение каждого поля зрения. Оценка показала, что микрочастицы хитозана в условиях эксперимента эффективно связывают флуоресцентно меченные белок/РНК за счет электростатической адсорбции. (рис. 4б,в). Полученные платформы сохраняли стабильность и функциональность в растворе в течение 24-48 час.

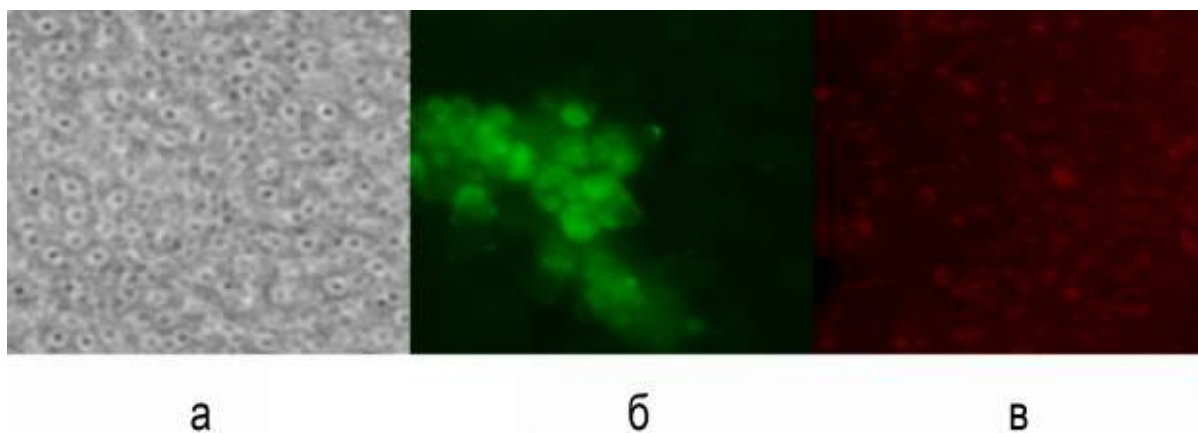


Рисунок 4. Фазово-контрастное изображение частиц хитозана и флуоресцентная микроскопия частиц хитозана, функционализированных БСА или тРНК, меченных флуоресцентными метками. а – микрочастицы хитозана (фазово-контрастное изображение). б – МЧХ, функционализированные БСА, меченным флуоресцеин изотиацианатом (ФИТЦ). в – МЧХ, функционализированные препаратом тРНК, меченным флуоресцентной меткой Су-3.

Инfiltrацию растительных клеток проводили микрочастицами хитозана, функционализированными белком/РНК/РНКП. Полученные суспензии/растворы частиц предварительно озвучивали при температуре 25°C в течение 10 мин. с частотой 50/60 Hz с использованием ультразвуковой мойки. Для инfiltrации тканей растений использовали методы механической и вакуумной инfiltrации. Механическую инfiltrацию проводили макроинъекцией с использованием инъекционного стерильного шприца без иглы. Препарат микрочастиц хитозана, функционализированных белком/РНК или комплексом белок-РНК, инfiltrировали в нижнюю поверхность листа через небольшое повреждение наружного эпидермиса. Площадь инfiltrации составляла не менее 1 см в диаметре. Вакуумную инfiltrацию проводили с использованием PDS-1000/He пушки (BioRad). Образцы (высечки листовой пластинки размером 5x5 мм, апикальные меристемы (около 10 меристем) или пазушные почки) помещали в камеру PDS-1000/He пушки, на образец наносили до 100 мкл приготовленного препарата, поднимали давление в камере до рекомендованного уровня, выдерживали в течение 60 сек, а затем снижали давление до нормального уровня. Инfiltrированные функционализированными микрочастицами хитозана клетки/ткани растения выдерживали в климатической камере или при комнатной температуре. Оценка результатов проводили на 2-3 день после инfiltrации методами флуоресцентной микроскопии или лазерной конфокальной микроскопии.

Полученные результаты показывают, что разработанный способ доставки

биологических макромолекул в клетки растений, основанный на инфильтрации (механической или вакуумной) препарата микрочастиц хитозана с иммобилизованными на их поверхности макромолекулами, обеспечивает эффективную доставку полученных наноплатформ, что подтверждается по выявлению меченных флуоресцентными метками белков и нуклеиновых кислот в клетках растений, прежде всего в клетках эпидермиса (рис. 5), а также результатами прямого секвенирования нового поколения в случае доставки в клетки специфичных CRISPR/Cas9 рибонуклеопротеидных комплексов (см. следующие разделы).

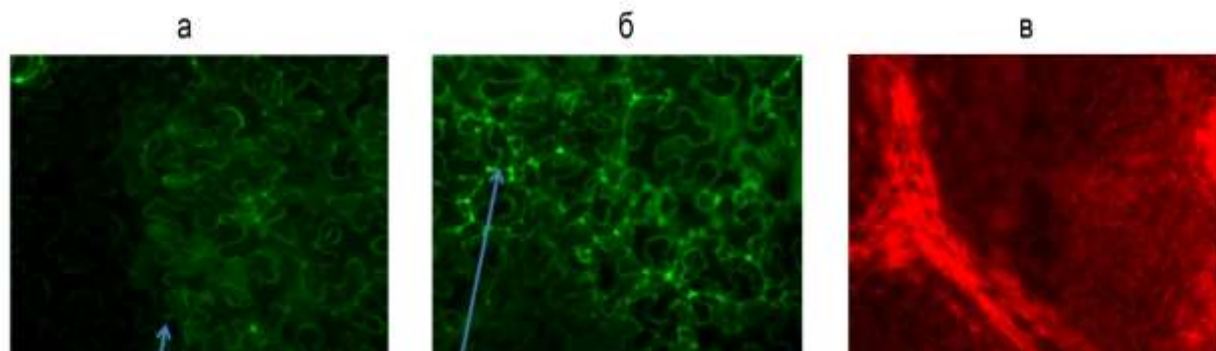


Рисунок 5. Доставка методом инфильтрации меченного БСА-ФИТЦ (а,б) и тРНК, меченной флуоресцентным красителем СуЗ (в), иммобилизованных на микрочастицах хитозана в клетки растений *Nicotiana benthamiana* в отсутствие микрочастиц золота (а) и в присутствии микрочастиц золота (б). На рис. 6а стрелкой показана граница зоны инфильтрации. На рис. 6б стрелка указывает на клетки губчатого мезофилла. На рис. 6в ярко окрашены клетки проводящего пучка.

3. Доставка рибонуклеопротеидного комплекса CRISPR/Cas9 в клетки апикальной меристемы для бесплазмидного редактирования генома картофеля

Solanum tuberosum

Для отработки метода бесплазмидной доставки системы CRISPR/Cas9 (РНП-комплексов) в клетки растений картофеля и тестирования ее активности как редактора генома в качестве модельного гена использовали ген картофеля, кодирующий фермент фитоен десатуразу. Фитоен десатураза (phytoene desaturase, PDS) катализирует ключевой этап биосинтеза каротиноидов, защищающих хлорофилл от фотоокисления; таким образом, выключение (нокаут) этого гена приводит к появлению белых пятен на листьях растения. Использование этого гена в качестве маркера позволяет выполнять визуальный отбор отредактированных клеток или тканей. В работе использовали кРНК1 к участку гена, кодирующему N-концевую область белка PDS (рис. 6), которая была отобрана на основании экспериментов, описанных в разделе 1 (рис. 1а, 2б). Коммерческий препарат эндонуклеазы Cas9 инкубировали с кРНК1 для получения редактирующего РНП-комплекса.

В качестве клеток, в которые доставляются предварительно собранные комплексы Cas9/кРНК мы предложили использовать клетки апикальной меристемы картофеля *Solanum tuberosum* L., технология получения которых и последующей регенерации рутинно используется при оздоровлении растений картофеля от вирусов.



Рисунок 6. Структура гена фитоена десатуразы картофеля с целевым участком, комплементарным короткой гидовой РНК (кгРНК1). Позиции нуклеотидов на матричной цепи ДНК соответствуют приведенным в базе данных (идентификационный номер NW_006238964, GenBank). Экзоны показаны как прямоугольники, интроны показаны сплошной линией. Кодирующая область и участок гена, на который нацелена кгРНК отмечены.

Меристемы (апикальные зоны делящихся клеток, выделенные из верхушечных и боковых побегов картофеля сорта Чикаго) переносили в чашки Петри на поверхность питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) без добавления гормонов и подвергали бомбардменту (метод биобаллистики) микрочастицами золота (0,6 мкм), или использовали разработанный нами оригинальный метод инфильтрации микрочастиц хитозана (0,6-0,8 мкм), с сорбированными на микрочастицах РНП-комплексами Cas9-кгРНК с использованием генной гелевой пушки. Меристемы, подвергнутые биобаллистике или инфильтрации микрочастицами, покрытыми только белком Cas9, использовали в качестве отрицательного контроля. Обработанные РНП-комплексом Cas9-кгРНК меристемы переносили в чашки Петри с питательной средой МС с добавлением фитогормонов и инкубировали в световом модуле для получения растений-регенерантов.

Визуальная оценка полученных растений-регенерантов показала, что эффективность редактирования (побеление листьев растений) при доставке редактора РНП-комплекса CRISPR/Cas9 методом биобаллистики функционализированными микрочастицами золота составила 2 линии из 90, а методом инфильтрации - 13 линий из 115. На рис. 7 приведен внешний вид растений-регенерантов отредактированных линий. Наши попытки определить факт редактирования методом фрагментного анализа, наиболее широко используемым способом, выявляющим одиночные индели в редактируемой последовательности, одиночные индели не выявил. Для оценки факта редактирования было проведено генотипирование линий, отобранных на основании визуального текста.

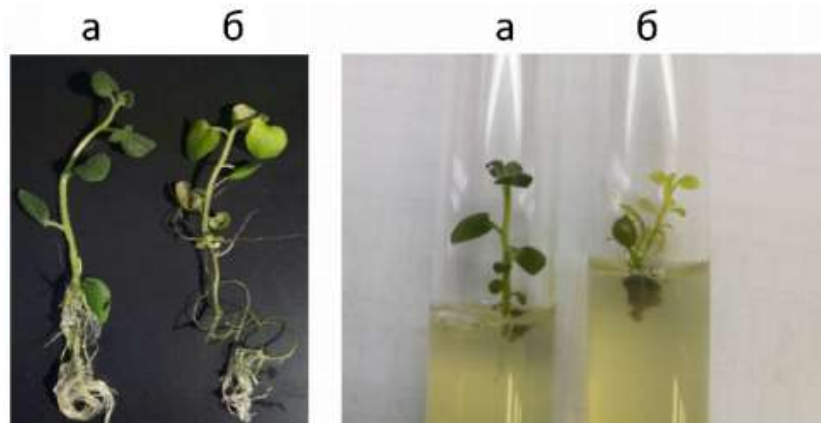


Рисунок 7. Внешний вид растений картофеля *S.tuberosum*, имеющих отредактированные

аллели по гену фитоен десатуразы. а – контрольные растения, б – отредактированные растения.

Из растений-регенерантов отобранных линий выделяли суммарный препарат ДНК, далее фрагмент целевой последовательности размером 100-150 пн амплифицировали и клонировали в *E.coli*. Для контрольной и каждой из редактированных линий получали не менее 30 колоний, из которых выделяли ДНК, проводили амплификацию фрагмента последовательности гена *PDS*, которая подвергалась редактированию, и полученный ПЦР-продукт секвенировали. На рис. 8 приведены результаты анализа для контрольной (растение, обработанное микрочастицами, функционализированными только белком Cas9) и двух отобранных линий, обработанных РНП-комплексами. Прежде всего, в обработанных РНП-комплексами (редактированных) и контрольных растениях были идентифицированы 4 аллеля, обозначенные как А1, А2, А3 и А4 (рис. 8а). Однако в отличие от контрольных растений в обеих редактированных линиях В10 (биоллистика) и J83 (инфильтрация) (рис. 8б,в) обнаруживаются только три из четырех аллелей: в линии В10 - аллели А1, А2 и А4, а в линии J83 - аллели А1, А2 и А3. Более того, в случае линии В10 аллель А1 обнаруживается только в 1 из 30 клонов (аллель А*) (рис. 8б). Наиболее вероятным объяснением этих данных является то, что протяженные нуклеотидные последовательности в аллеле А3 в линии В10 и в аллеле А4 в линии J83 делетированы в составе фрагмента, связывающего гидовую РНК, вследствие чего они не амплифицируются при проведении ПЦР.

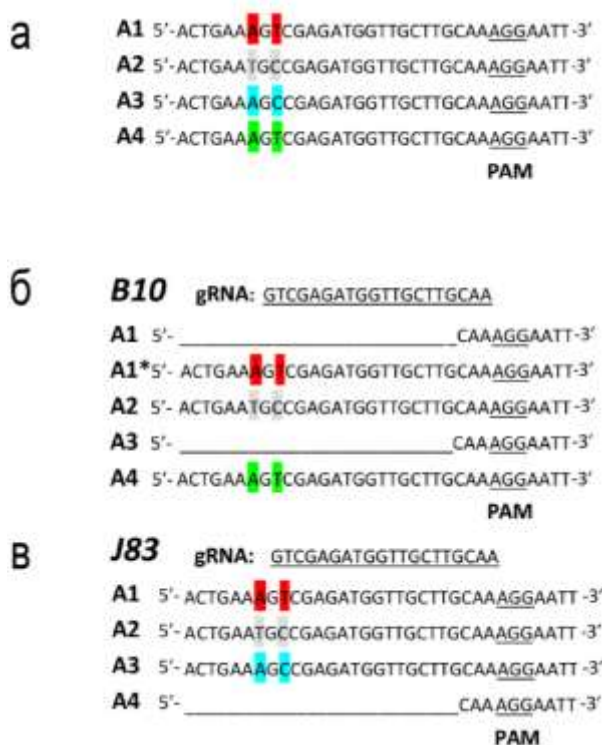


Рисунок 8. Нуклеотидная последовательность целевого фрагмента в гене *PDS* контрольного нередактированного растения (а) и редактированных линий В10 (б) и J83 (в). Выявленные аллели обозначены как А1, А2, А3 и А4; цветом показаны нуклеотидные замены, характерные для выявленных аллелей, и делеция в аллеле А4; сплошная линия – делетированные нуклеотиды. Подчеркнута последовательность гена, на которую нацелена кРНК. РАМ-сайт отмечен шрифтом с подчеркиванием.

Для поиска длинных делеций в редактируемом гене был использован метод

глубокого секвенирования (NGS) области ДНК размером около 1500 пн, которая включает участок, комплементарный гидовой РНК. В результате в редактируемой последовательности были выявлены делеции, начинающихся за три нуклеотида до РАМ-сайта и частично затрагивающие участок связывания кРНК размером 489 и 497 пн в двух аллелях у линии В10 (аллели А1, А3) и размером 574 пн в одном аллеле (аллель А4) у линии J83, редактированных РНП-комплексом Cas9-кРНК (рис. 9). В контрольных необработанных растениях такие делеции выявлены не были.

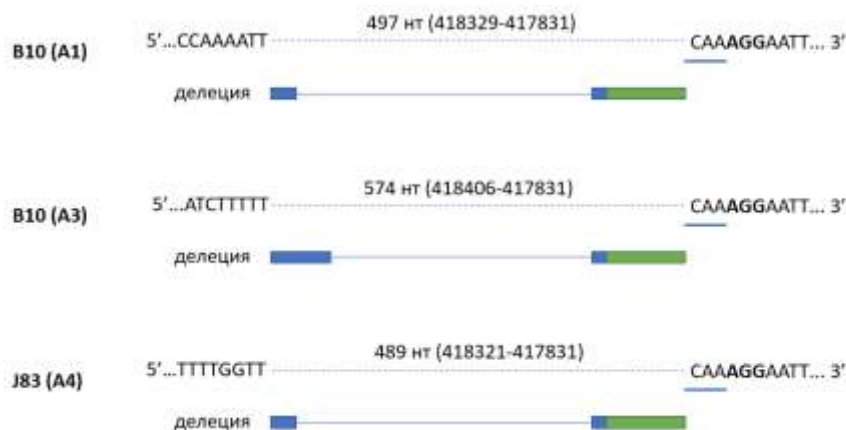


Рисунок 9. Положение протяженных делеций в аллелях гена фетоеи десатуразы линий В10 и J83. Последовательности аллелей в целевом фрагменте гена колина обозначены как А1, А2 и А3. Прямоугольники соответствуют экзонам. Делеции нуклеотидов показаны пунктирной линией. Размер делеции указан в нт, в скобках даны позиции первого и последнего нуклеотида в ориентации, соответствующей базе данных (идентификационный номер NW_006238964, GenBank). Положение кРНК показано прямой линией слева от РАМ-сайта, который отмечен жирным шрифтом.

Следует отметить, что все обнаруженные делеции частично затрагивают два 5'-концевых экзона и полностью элиминируют интрон между ними, что приводит к значительному снижению экспрессии гена PDS в линиях В10 и J83 по сравнению с контрольным растением (показано методом ОТ-ПЦР; рис. 10). Наблюдаемое снижение экспрессии, возможно, объясняется изменением нормального процесса сплайсинга мРНК. В целом, редактирование гена PDS затрагивает не более 2 аллелей (как в случае линии В10), что может объяснить полученные нами результаты визуального наблюдения редактированных линий: побеление листьев наблюдается на ранних этапах развития растения (до 7-8 листка проростка)(рис. 7) и исчезает при его дальнейшем росте. Очень низкая частота аллеля А1 (А1*) в линии В10 может указывать на химерную природу редактированного растения. Однако большинство клеток, видимо, химерами не являются.



Рисунок 10. Уровень экспрессии гена *PDS* в контрольном растении и редактированных линиях растений-регенерантов, определенный методом полуколичественной ОТ-ПЦР, в сравнении с уровнем экспрессии гена белка L23 большой субъединицы рибосомы

В работах по редактированию генома картофеля, который является тетраплоидом, исследователи использовали метод трансфекции плазмидной ДНК (Andersson et al., 2017) или бесплазмидную доставку РНП-комплекса CRISPR/Cas9 (Andersson et al., 2018) в изолированные протопласты картофеля. В этом случае удалось отредактировать все четыре аллеля целевого гена. Вместе с тем известно, что получение протопластов картофеля является трудоемкой задачей, а регенерация протопластов занимает от 6 до 9 месяцев. В настоящей работе для разработки значительно менее трудоемкого метода редактирования генома картофеля с помощью доставки РНП-комплекса CRISPR/Cas9 мы использовали клетки апикальной меристемы растения. Ключевым преимуществом апикальной меристемы является простота ее дальнейшей регенерации в целые растения, которая широко используется в производстве безвирусного картофеля и таким образом не требует дополнительной технологической адаптации. Кроме того, процесс получения сформировавшихся растений занимает не более 2-х месяцев. Для доставки РНП-комплекса CRISPR/Cas9 был применен достаточно широко используемый метод биобаллистики клеток РНП-комплексами, иммобилизованными на микрочастицах золота (Martin-Ortigosa et al. 2014), и новый ранее не применявшийся метод инфльтрации РНП-комплексов, иммобилизованных на микрочастицах хитозана. Генетический анализ показал, что нам удалось отредактировать 1 аллель гена *PDS* при использовании метода инфльтрации и 2 аллеля этого гена при использовании метода биобаллистики. Генетические данные подтверждены ингибированием экспрессии целевого гена в случае обеих линий и временным побелением отредактированных растений. Мы не обнаружили одиночные индели в редактируемой последовательности, которые ранее были описаны при трансформации протопластов картофеля (Andersson et al., 2017), но выявили протяженные делеции в одном аллеле (линия J83) или двух аллелях (линия В10), начинающиеся за 3 нуклеотида до РАМ-сайта и частично затрагивающие участок связывания кГРНК (рис. 9).

4. Редактирование гена коилина в растениях картофеля *Solanum tuberosum* L.

Коилин – это главный структурный белок, контролирующий формирование, состав и активность субъядерных телец Кахаля (ТК), физически и функционально ассоциированных с ядрышками. ТК участвуют в метаболизме РНК и сборке разнообразных РНП-комплексов, включая созревание некоторых ядерных РНК и сборку, модификацию и транспорт различных классов РНП-частиц. Растущее число данных свидетельствует о том, что ядрышки и ТК также принимают участие во многих других важных клеточных функциях таких как клеточный рост, гибель, клеточный цикл и ответы на стресс (Bassett 2012; Boulon et al. 2010; Love et al. 2017). Ранее используя модельную систему растений *Nicotiana benthamiana*, было показано, что коилин и ТК также влияют на взаимодействия между растениями-хозяевами и вирусами (Shaw et al., 2014). Трансгенные растения, в которых экспрессия гена коилина была подавлена с помощью механизма РНК-интерференции, отвечали по-разному на заражение вирусами, принадлежащими к различным таксономическим группам. Так, в отсутствие коилина наблюдалось значительное угнетение инфекции растений РНК-содержащим Y вирусом картофеля (YBK, род *Potyvirus*) (Shaw et al., 2014), одним из наиболее опасных и экономически важных патогенов картофеля. Кроме того, было показано, что коилин вовлечен в ответ растения на абиотический солевой стресс (Love et al. 2017). Механизмы

участия коилина в защитных ответах растения на стрессы разной природы остаются малоизученными. Растительный ген коилина рассматривался нами как перспективная мишень для редактирования с целью получения линий картофеля, устойчивых к заражению YBK и абиотическим стрессам. В связи с этим мы редактировали ген коилина в растениях картофеля *Solanum tuberosum* L. сорт Чикаго, используя технологию CRISPR–Cas9 и метод бесплазмидной доставки редактирующего комплекса в клетки меристемы.

Коилины и коилин-подобные белки растений не имеют строгой эволюционной консервативности в аминокислотной последовательности, однако структура их молекул, видимо, построена на основании общих принципов (Makarov et al. 2013). Молекула коилина арабидопсиса состоит из трех основных доменов: N-концевого глобулярного домена, центрального высоко неупорядоченного домена и C-концевого домена (CTD), включающего предполагаемую Тюдор-подобную структуру и неупорядоченный C-конец (Makarov et al. 2013). Для редактирования были выбраны районы гена коилина картофеля, кодирующие N-концевой и C-концевой домены (CTD), последний вовлечен во взаимодействия с белками клетки, важными для функции ТК (Xu et al. 2005; Toyota et al. 2010). Нам не удалось синтезировать активную *in vitro* кГРНК к последовательностям, кодирующим N-концевой домен, а из пяти кГРНК к последовательностям, кодирующим CTD, была активна только одна – кГРНК3 (рис. 11). Синтез *in vitro* и анализ активности этой кГРНК описаны в разделе 1 (рис. 1, 2б).

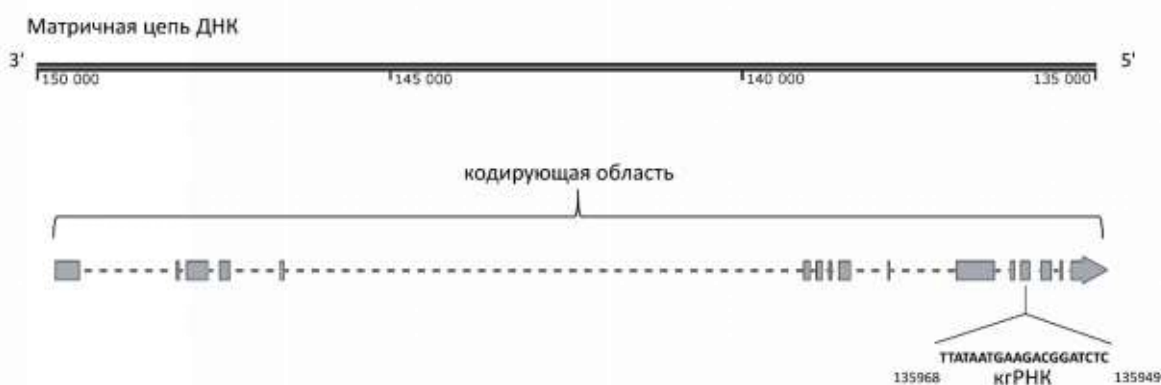


Рисунок 11. Структура гена коилина картофеля с целевым участком, комплементарным короткой гидовой РНК (кГРНК3). Позиции нуклеотидов на матричной цепи ДНК соответствуют приведенным в базе данных (идентификационный номер NW_006239172, GenBank). Экзоны показаны как прямоугольники, интроны показаны пунктирной линией. Кодированная область и участок гена, на который нацелена короткая кГРНК отмечены.

Последующие этапы, были аналогичны описанным при редактировании гена *PDS* картофеля (раздел 3). Меристемы переносили в чашки Петри на поверхность питательной среды МС без добавления гормонов и подвергали или биобаллистике золотыми микрочастицами (0,6 мкм), или инфильтрации микрочастицами хитозана (0,6-0,8 мкм), с сорбированными на них предварительно образованными РНП-комплексами Cas9-кГРНК. Обработанные РНП-комплексом Cas9-кГРНК меристемы переносили в чашки Петри с питательной средой МС с добавлением фитогормонов и инкубировали в световом модуле для получения растений-регенерантов.

Поскольку, как и в предыдущем случае при редактировании гена *PDS*, метод фрагментного анализа не выявил инделей в редактируемой последовательности гена коилина, мы проанализировали уровень экспрессии этого гена в полученных растениях-

регенерантах методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). На рис. 12а представлены типичные результаты анализа нескольких линий, на основании которых были отобраны две линии D15 и F25 со сниженным по сравнению с контрольными растениями уровнем экспрессии гена, полученные при доставке РНП-комплекса Cas9/кгРНК путем бомбардировки меристем золотыми микрочастицами или вакуумной инфльтрации микрочастиц хитозана с сорбированным комплексом, соответственно. Дальнейший анализ путем генотипирования отредактированных линий по фрагменту целевой последовательности гена коилина размером 150 пп показал полное отсутствие последовательности одного из аллелей у каждой из линий, которые отличались у разных линий, что позволило предположить наличие более протяженных делеций (данные не показаны).

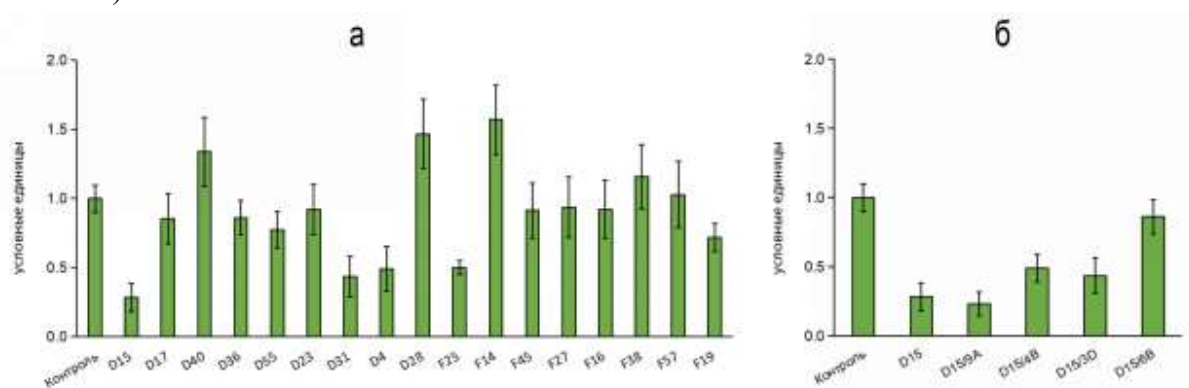


Рисунок 12. Уровень экспрессии гена коилина, определенный методом ПЦР в реальном времени, в контрольном растении и первично отредактированных линиях (а) и линиях после второго цикла редактирования (б). Линии, полученные при редактировании клеток меристем методом биобаллистики, обозначены как линии D; линии, полученные методом вакуумной инфльтрации, обозначены как линии F. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего.

Для их выявления был использован метод глубокого секвенирования (NGS) ампликонов размером около 1100 пп, включающих участок связывания кгРНК. В результате были обнаружены протяженные делеции у линии D15 размером 561 пп, а у линии F25 размером 552 пп, начинающиеся за три нуклеотида до РАМ-сайта и частично затрагивающие участок связывания кгРНК (рис. 13а). В контрольных необработанных растениях делеции выявлены не были. Таким образом, менее чем за два месяца с использованием предложенной технологии нам удалось получить модифицированные линии, по крайней мере, с одним отредактированным аллелем целевого гена.

С целью изучения возможности повышения эффективности метода и увеличения числа отредактированных аллелей было проведено повторное редактирование полученных и охарактеризованных как мутантные линий картофеля. Для этого была выбрана линия D15, апикальные меристемы которой обстреливали золотыми микрочастицами с иммобилизованным РНП-комплексом Cas9/кгРНК, используя увеличенные вдвое концентрации рекомбинантной эндонуклеазы Cas9 и кгРНК. В экспериментах использовали ту же кгРНК, что и в первом раунде редактирования. Растения полученных линий анализировали на уровень экспрессии гена коилина методом ПЦР-РВ. Для детального анализа была выбрана линия D15/9A, уровень экспрессии гена коилина в которой был снижен по сравнению с исходной линией D15 на 20% (рис. 12б). На рис. 13б приведены данные, полученные методом глубокого секвенирования нового поколения

(NGS) ампликонов размером около 1100 пн для линии D15/9A. Наряду с делецией размером 561 пн в аллеле A1, выявленной ранее у линии D15 (при повторном редактировании аллель A1 не затрагивался, поскольку фрагмент, соответствующий кГРНК уже был в нем делетирован), дополнительно было выявлено два новых варианта делеций. Одна делеция размером 561 пн, идентичная по размеру делеции в аллеле A1, являлась модифицированной версией другого аллеля (обозначен как A2), содержащего маркер CGG (РАМ-сайт), отличный от маркера аллеля A1 (TGG). Второй вариант содержал меньшую делецию в 524 пн и маркер CGG. В настоящее время не представляется возможным определить принадлежат ли оба этих варианта к одному и тому же или к разным аллелям (обозначены на рис. 15б как A2*/A3). Все выявленные делеции были расположены за три нуклеотида до РАМ-сайта и частично затрагивали участок связывания кГРНК.

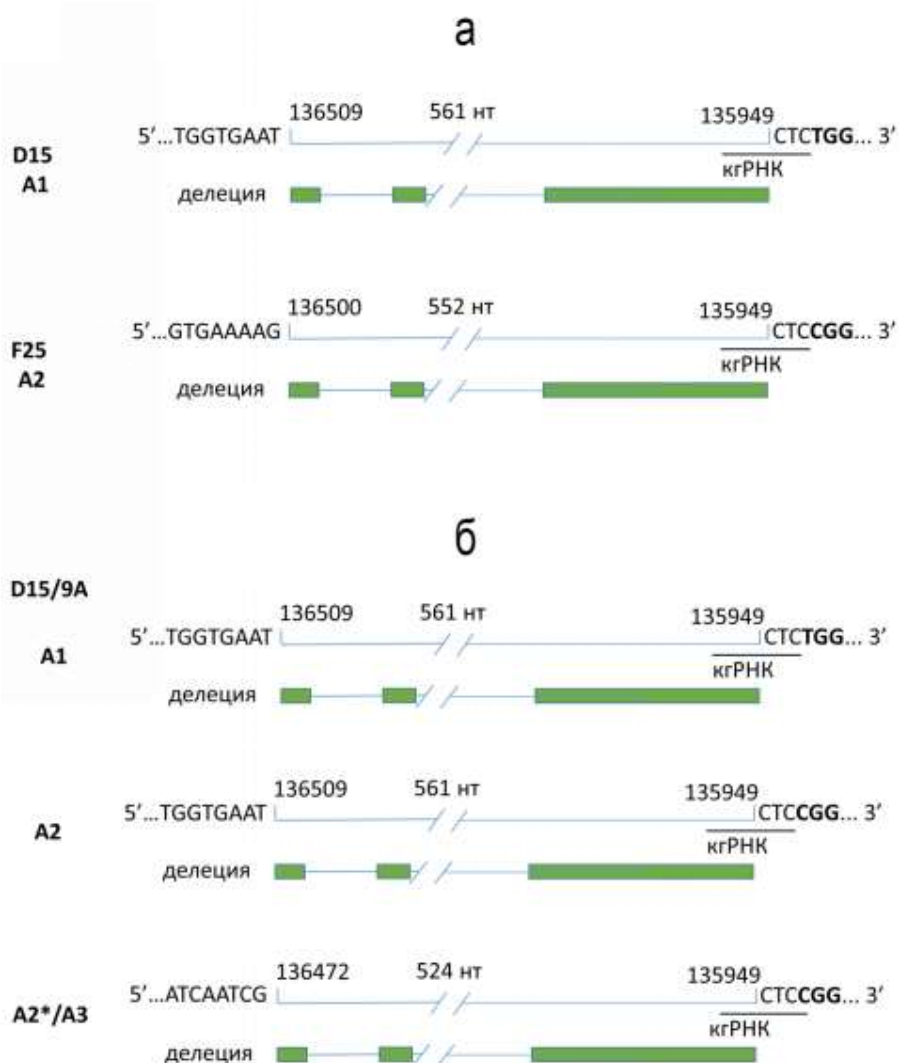


Рисунок 13. Положение протяженных делеций в аллелях гена коилина линий D15 и F25 (а) и повторно отредактированной линии D15/9A (б). Последовательности аллелей в целевом фрагменте гена коилина обозначены как A1, A2 для линий D15 и F25 и A1, A2, A2*/A3 для линии D15/9A. Прямоугольники соответствуют экзонам. Делеции нуклеотидов показаны скобками. Размер делеции указан в нт, по концам интервала даны позиции первого и последнего нуклеотида в ориентации, соответствующей базе данных (идентификационный номер NW_006239172, GenBank). Положение кГРНК показано прямой линией слева от РАМ-сайта, который отмечен жирным шрифтом.

Таким образом, повторное редактирование увеличивало число отредактированных аллелей до трех, однако, как видно на рис. 12б, незначительно снижало экспрессию гена коилина. Этот эффект может быть связан с тем обстоятельством, что гомоаллели (гомеоаллели) гена коилина экспрессируются неодинаково (сильно или слабо) и, следовательно, вносят неравный вклад в последующий синтез данного белка в растении. Очевидно, что редактирование первого из аллелей внесло основной вклад в угнетение экспрессии гена коилина и выявленный биологический эффект повышения устойчивости отредактированной линии к заражению вирусом и абиотическим стрессам (см. следующий раздел). Интересно, что аллельные вариации в экспрессии генов часто встречаются в гибридах и полиплоидных растениях некоторых видов.

Таким образом, в настоящей работе мы показали, что доставка редактирующего РНП-комплекса Cas9/кгРНК в клетки апикальной меристемы картофеля методом биобаллистики функционализированными микрочастицами золота или методом вакуумной инфльтрации функционализированными микрочастицами хитозана, является простым, быстрым и недорогим методом, позволяющим специфическое и достаточно эффективное редактирование целевого гена. Редактирование гена коилина с использованием этой технологии приводит к возникновению только длинных делеций, начинающихся за три нуклеотида левее PAM-сайта, размером чуть более 500 пн. Подобные протяженные делеции не были выявлены ранее при knock-out редактировании генов растений с помощью технологии CRISPR/Cas9.

Действительно, геномное редактирование ДНК системой CRISPR/Cas9, как правило, приводит к появлению в редактируемом гене вставок и/или делеций (так называемых инделей) размером менее 20 пн (Koike-Yusa et al., 2014; vanOverbeek et al., 2016; Tan et al., 2015). Так, при редактировании генов картофеля с помощью различных подходов в подавляющем числе выявлялись одиночные индели длиной до 20 пн. Эти результаты были получены при агротрансформации стеблевых эсплантов и петиолей картофеля (Andersson et al., 2017; Danielsen et al., 2004), при трансфекции генно-инженерных конструкций или доставке преформированного РНП-комплекса в протопласты (Andersson et al., 2018; Andersson et al., 2016). Сходным образом, редактирование генома в протопластах кукурузы и пшеницы методом бомбардмента редактирующим РНП-комплексом, сорбированным на микрочастицах золота, также приводило к возникновению небольших инделей (1-10 пн) (Svitashev et al., 2016; Lian et al., 2017). В последнее время для повышения эффективности редактирования протопластов картофеля авторы использовали (одновременно две гидовые РНК, комплементарные различным участкам редактируемого гена, в этом случае наряду с небольшими инделями наблюдаются и длинные делеции (в среднем от 100 до 300 пн), расположенные как симметрично, так и ассиметрично относительно PAM-сайта. Появление таких делеций вызвано тем, что эндонуклеаза Cas9 вносит разрывы в обоих участках, что приводит к удалению фрагмента между ними (Standage-Beier et al., 2015; Shen et al., 2014). В нашей системе возникновение длинных делеций наблюдается при использовании одной кгРНК.

Вместе с тем, анализ изменений, вносимых системой CRISPR/Cas9, в геном клеток животных значительно разнообразнее и описывает возникновение протяженных делеций до 1500 пн (Ghezraoui et al., 2014; Hendele et al., 2015; Shin et al., 2017; Kosicki et al., 2018), в частности, при редактировании активно транскрибируемых локусов ДНК и ДНК клеток с повышенной митотической активностью (Kosicki et al., 2018). Мы предполагаем, что клетки меристемы растений по типу деления клеток/транскрипционной активности

напоминают вышеупомянутые животные системы. Таким образом, образование подобных мутаций, впервые выявленных при редактировании клеток меристемы растений, вероятно, имеет сходный механизм с быстро делящимися клетками животных. Одна их вероятных причин появления подобных делеций заключается в структуре хроматина, имеющей важное значение при модификациях генома.

Как уже отмечалось (раздел 3), при редактировании гена *PDS* картофеля с использованием предложенного нами метода также были обнаружены длинные делеции сходного типа в отредактированной последовательности. Эти данные позволяют нам сделать вывод, что редактирование клеток меристем преформированным редактирующим комплексом сопровождается появлением длинных делеций в несколько сотен нуклеотидов (в диапазоне от 400 до 600 пн), расположенных стандартно за три нуклеотида до РАМ сайта. С практической точки зрения подобные делеции не являются недостатком системы, а возможно, даже являются ее преимуществом, поскольку труднее или практически не поддаются реверсиям.

Технологическая простота предложенного метода и высокая эффективность регенерации растений выгодно отличает его от широко используемого в настоящее время метода с использованием протопластов картофеля, к ограничениям которого, кроме методических проблем, связанных с получением протопластов из отдельных сортов растений, низкой эффективностью и более длительным сроком регенерации, относится наличие большого числа самоклональных вариаций в растениях-регенерантах.

Важно отметить, что при одном или двух циклах редактирования технология приводит только к частичному редактированию целевого гена, затрагивающему от 1 до 3 аллелей из четырех. Такое редактирование уменьшает уровень экспрессии гена (*gene knock-down*), но не «выключает» его экспрессию полностью (*gene knock-out*). Частичное редактирование важно при редактировании существенных генов (генов домашнего хозяйства), полное выключение которых приводит к изменению фенотипа растения, снижению его выживаемости и даже гибели.

5. Функциональный анализ роли коилина в устойчивости растений картофеля *Solanum tuberosum* к вирусной инфекции и абиотическим стрессам

Редактированные линии растений картофеля анализировали на устойчивость к заражению Y-вирусом картофеля и к абиотическим (солевой и осмотический) стрессам.

Устойчивость редактированных линий картофеля к заражению YВК⁰ (штамм обыкновенный) изучали в двух сериях экспериментов. В первой серии пробирочные растения-регенеранты контрольной и отредактированных линий F25 и D15 (по 10–20 растений в каждой группе) заражали YВК⁰ и через 28 дней после инокуляции (дпи) из растений выделяли суммарный препарат РНК для дальнейшего анализа. Во второй серии опытов взрослые растения картофеля (контрольные линии и линии F25 и D15) на стадии 5–6 листьев (10 растений в каждой группе) заражали YВК⁰ и через 28 дпи из системных симптоматических листьев каждого растения выделяли суммарный препарат РНК. Вирусную РНК определяли полуколичественным методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). В качестве гена сравнения использовали ген рибосомного белка L23. В обеих сериях экспериментов было выявлено значительное уменьшение доли заражённых вирусом растений в случае линий, отредактированных по гену коилина, по сравнению с контрольными растениями (рис. 14). Так, по сравнению с контрольными растениями резистентность к вирусной инфекции линии D15 была выше в 2,7 и 2 раза, а

линии F25 – в 10 и 4 раза в опытах *in vitro* и *in vivo* соответственно.

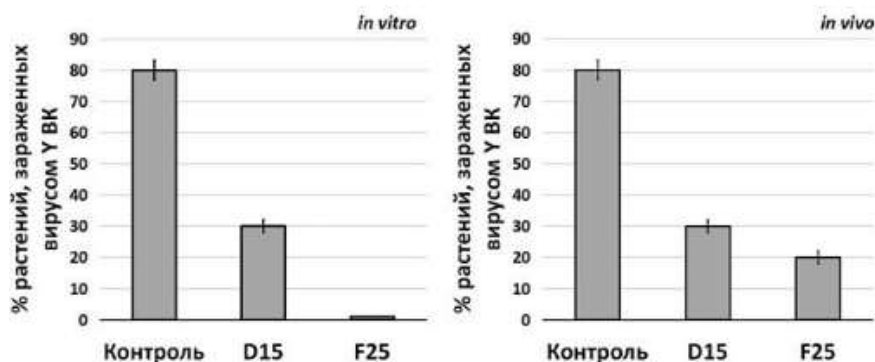


Рисунок 14. Уровень устойчивости растений к заражению вирусом YBK. На графиках показана доля (в процентах от общего числа заражённых YBK-О растений) контрольных растений и растений редактированных линий, в которых была выявлена вирусная инфекция. Слева эксперимент *in vitro*, справа - *in vivo*.

Далее была исследована устойчивость редактированных линий к двум типам абиотического стресса – солевому и осмотическому. Ответ на солевой стресс оценивали визуально по числу листьев с хлорозами и пониженным тургором, а также по размеру листовой пластинки. Видимые различия между группами контрольных растений и редактированных линий проявились на 11 день опыта: в условиях солевого стресса у контрольных растений наблюдали ускоренное пожелтение и опадание листьев по сравнению с редактированными линиями. Дополнительно обнаружили заметное ингибирование развития и деформацию листовой пластинки. Через 18 дней симптомы развития стресса усилились. Однако различия в устойчивости к стрессу между контрольными растениями и редактированными линиями сохранились (рис. 15а).

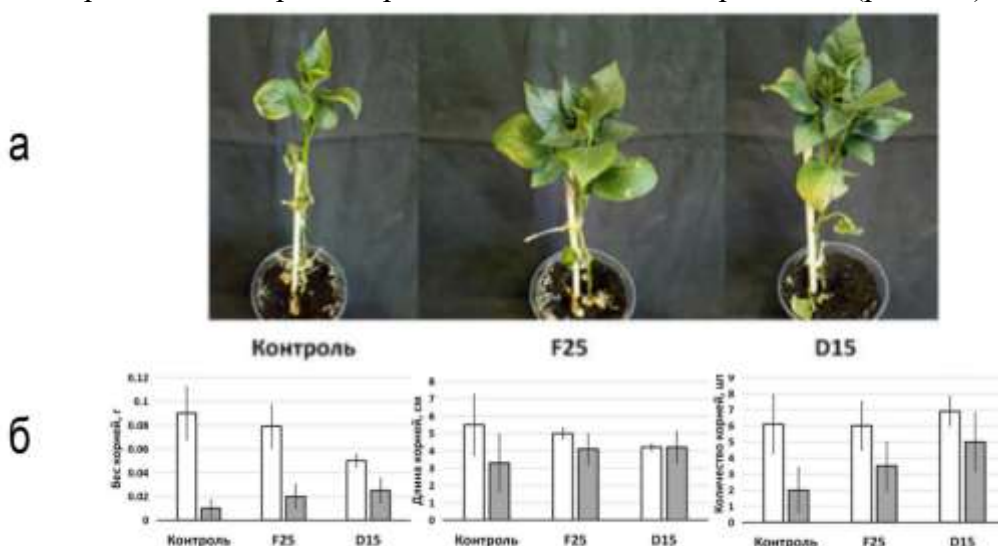


Рисунок 15. Влияние солевого и осмотического стресса на фенотип растений картофеля. Различия между контрольными растениями и растениями редактированных линий через 18 дней после ежедневной обработки раствором 300 мМ NaCl (а). Влияние осмотического стресса на рост и развитие корневой системы пробирочных растений (б). Измерялся вес корней, их длина и количество. На графиках - итоговые результаты трёх независимых экспериментов, $M \pm SD$, $n = 10$ для каждой группы, $*p < 0,05$ по критерию t Стьюдента по сравнению с контролем.

Влияние гиперосмотического стресса изучали у пробирочных растений контрольной линии и редактированных линий F25 и D15. Оценивали следующие параметры: сырой вес целого растения, вес надземного побега и корня, а также длину и общее число корней. Между контрольными растениями и редактированными линиями мы не зафиксировали заметного различия по весу надземного побега, однако суммарный вес корней отличался у контрольных и редактированных растений (рис. 15). Присутствие в среде сорбитола угнетало развитие корневой системы приблизительно в 9 раз в контроле и соответственно в 4 и 2 раза у редактированных линий F25 и D15. Сорбитол практически не влиял на длину корней у редактированных линий, тогда как у контрольных растений этот показатель уменьшился почти в 2 раза. Число корней в присутствии сорбитола снизилось у контрольных растений в 3 раза, у растений линии F25 – в 2 раза, а у линии D15 – в 1,4 раза (рис. 15). В целом бóльшая устойчивость к осмотическому стрессу у редактированных по гену коилина линий, видимо, обусловлена более эффективным развитием их корневой системы.

Таким образом, эксперименты по редактированию гена коилина в растениях картофеля подтвердили результаты, полученные ранее на модельной системе – растения *N. benthamiana* – YVK (Shaw et al 2014), продемонстрировав, что «выключение» даже одного аллеля этого гена приводит к выраженному увеличению резистентности редактированных линий к заражению YVK и повышению устойчивости к абиотическим солевым и осмотическим стрессам.

Пробирочные растения, редактированные по гену коилина (линии F25 и D15, а также линия D15/9A) и контрольные растения сорта Чикаго (по 30-35 растений каждого варианта) были высажены в поле на опытные делянки (рис. 16) на естественном инфекционном фоне в июне 2018 г. на территории селекционно-генетической фирмы ООО «Дока-генные технологии» (с. Рогачево, Дмитровский район). В ходе вегетации была проведена оценка контрольных и опытных образцов по морфологическим и агрономическим признакам. Измерение высоты растений и отбор растительных проб для оценки на зараженность YVK (методом иммуноферментного анализа) был проведен дважды в течение вегетации – через 30 и 45 дней после высадки растений в поле. В конце вегетации был проведен учет массы всех полученных клубней и рассчитана продуктивность одного растения (масса всех собранных клубней, деленная на количество растений на делянке в каждом варианте).

В ходе вегетации не было отмечено различий между растениями редактированных линий по гену коилина и контрольных растений по морфологии куста, листьев, соцветий и цветков. Исключение составил такой признак как высота растения. Растения редактированных линий по гену коилина были выше контрольных растений сорта Чикаго в среднем на 5-10 см (рис. 16б).

ИФА, проведенный дважды в течение вегетации, показал, что количество зараженных YVK растений в контрольном сорте Чикаго было выше, чем в редактированных по гену коилина растениях линий F25 и D15 (рис. 19в). Наибольшую устойчивость продемонстрировала линия D15, у которой на 45-ый день вегетации из всех высаженных на делянку растений только 20% оказались зараженными вирусом, в то время как в исходном сорте Чикаго (контроль) 64% растений были поражены этим вирусом. Как следствие минимальной зараженности вирусом, линия D15 (но не линия F25) продемонстрировала максимальную продуктивность – в среднем 648 г клубней с одного растения. Интересно, что продуктивность повторно редактированной линии D15/9A

также была выше продуктивности исходного сорта Чикаго (рис. 19г).

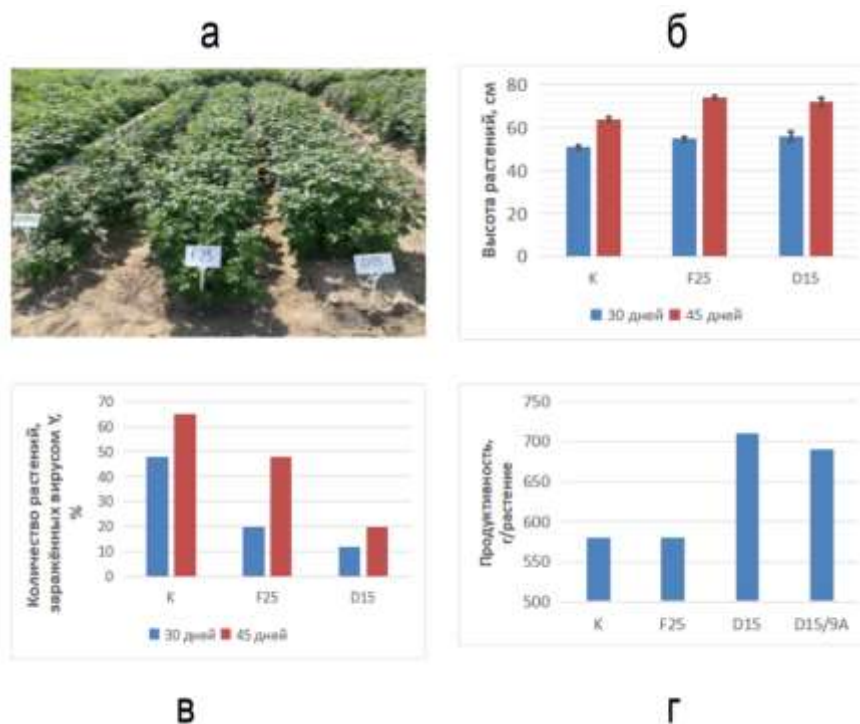


Рисунок 19. Характеристики редактированных линии картофеля, полученные в полевых условиях. Опытная делянка с высаженными на них растениями картофеля (а); высота растений (б), количество растений, зараженных YBK на естественном фоне, среди редактированных по гену коилина линий и контрольных (К) растений сорта Чикаго, измеренная методом ИФА в ходе вегетации через 30 и 45 дней после высадки пробирочных растений в поле (в) и продуктивность контрольных (К), растений, редактированных по гену коилина линий (F25 и D15) и повторно редактированных (D15/9A), определенная как масса всех собранных клубней, деленная на количество растений на делянке в каждом варианте (г).

Таким образом, результаты, полученные в лабораторных экспериментах, были подтверждены данными испытаний редактированных линий растений в полевых условиях на естественном инфекционном фоне.

В заключение следует отметить, что оптимизация методов бесплазмидного редактирования, позволяющих получать растения с заданными свойствами, которые не попадают под действие регуляторных мер, ограничивающих использование ГМО, открывает большие возможности для улучшения полезных признаков в случае гетерозиготных, полиплоидных и вегетативно размножаемых культур, каким является картофель.

Предложенный нами технологически простой метод быстрого получения редактированных растений картофеля с использованием меристем может быть полезным для модификации существенных генов, в частности, генов, отвечающих за устойчивость растений к стрессам разной природы, в любых коммерчески важных сортах картофеля.

Выводы

1. Проведен дизайн коротких гидовых РНК (кгРНК) к высоко консервативным участкам генов фитоен десатуразы (*PDS*) и коилина растений картофеля *Solanum tuberosum*L. Проведена оценка *in vitro* эффективности синтезированных кгРНК в разрезании целевого участка генов рекомбинантной эндонуклеазой Cas9.
2. Разработан способ доставки в клетки растений *Nicotiana benthamiana* и *Solanum tuberosum* платформ на основе микрочастиц хитозана с иммобилизованными на их поверхности флуоресцентно меченными модельными белками и короткими РНК с помощью инфильтрации комплексов в листья растений. Показано, что наноплатформы способны доставлять биомолекулы в клетки эпидермиса листьев растений.
3. Отработаны условия доставки редактирующего комплекса (рекомбинантная эндонуклеаза:кгРНК) в клетки растений картофеля *S.tuberosum* путем бомбардмента или вакуумной инфильтрации с использованием в качестве платформ микрочастиц золота и микрочастиц хитозана. В качестве редактируемых клеток выбраны апикальные зоны делящихся клеток, выделенные из верхушечных и боковых побегов растений картофеля сорта Чикаго.
4. С использованием бесплазмидных технологий для доставки редактирующих компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки растений картофеля проведено редактирование двух генов – гена *PDS* и гена коилина. Для отбора отредактированных линий использовали визуальную оценку растений-регенерантов и данные ОТ-ПЦР (ген фитоен десатуразы), анализ методом количественной ПЦР-РВ (ген коилина), а также результаты генотипирования целевой последовательности генов размером 100-150 пн.
5. С использованием метода глубокого секвенирования (NGS) в целевой области ДНК размером около 1500 нт, которая включает участок, комплементарный кгРНК в отредактированных линиях картофеля по генам фитоен десатуразы и коилина показано, что редактирование генома клеток меристем сопровождается появлением протяженных делеций размером в среднем от 400 до 600 пн.
6. Редактированные по гену коилина линии растений-регенерантов картофеля демонстрировали повышенную устойчивость к заражению Y-вирусом картофеля (YBK, род *Potyvirus*) и к абиотическим осмотическому и солевому стрессам в опытах *in vitro* и *in vivo*. Растения картофеля отредактированных линий, выращенные в полевых условиях, проявили повышенную резистентность к заражению YBK на естественном фоне, эффективнее развивались и отличались повышенной продуктивностью.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Хромов А.В., Гущин В.А., Тимербаев В.И., Калинина Н.О., Тальянский М.Э., Макаров В.В., (2018) Конструирование гидовых РНК для редактирования генома картофеля с использованием системы CRISPR/Cas9. Доклады Академии наук, 479:3:343-347 **IF = 1.058**
2. Хромов А.В., Махотенко А.В., Снигирь Е.В., Макарова С.С., Макаров В.В., Супрунова Т.П., Калинина Н.О., Тальянский М.Э. (2018) Доставка рибонуклеопротеидного комплекса CRISPR/Cas9 в клетки апикальной меристемы для бесплазмидного редактирования генома картофеля *Solanum tuberosum*. Биотехнология, 34:6 **IF = 0.557**
3. Махотенко А.В., Хромов А.В., Снигирь Е.А., Макарова С.С., Макаров В.В., Супрунова Т.П., Калинина Н.О., Тальянский М.Э. Функциональный анализ роли колина в устойчивости растений картофеля *Solanum tuberosum* к вирусной инфекции и абиотическим стрессам с использованием системы редактирования CRISPR/Cas9. (2019) Доклады Академии наук, 484:6:772-776 **IF = 1.058**
4. Макарова С.С., Хромов А.В., Спеченкова Н.А., Тальянский М.Э., Калинина Н.О. (2018) Использование системы CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к патогенам. Биохимия, 84:1:24-37 **IF = 2.178**
5. Kalinina N, Khromov A., Andrew J. Love, and Taliansky M. CRISPR Applications in Plant Virology: Virus Resistance and Beyond (2019). *Phytopathology* 110:1, 18-28 **IF = 2.980**

Патент РФ

Патент RU2663347C1: Долгов С.В., Калинина Н.О., Макаров В.В., Макарова С.С., Махотенко А.В., Мирошниченко Д.Н., Снигирь Е.А., Супрунова Т.П., Тальянский М.Э., Тимирбаев В.Р., Хромов А.В. (2018). Способ доставки биологически активных макромолекул в клетки растений