

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Хромова Андрея Владимировича
на тему: «Бесплазмидное редактирование генома растений картофеля
системой CRISPR/Cas9»
по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»**

На современном этапе новые технологии редактирования генома открывают широкие возможности для получения растений, устойчивых к инфекциям разной природы, в том числе к вирусным инфекциям. Известно, что вирусные инфекции являются причиной практически половины всех эпифитотий, существенно снижая продуктивность сельскохозяйственных культур, вкусовые, товарные качества и сроки хранения продукции. Наиболее популярной и перспективной технологией редактирования генома является технология CRISPR/Cas9, позволяющая вносить целенаправленные изменения в гены вирусов и растений-хозяев. Диссертационная работа Хромова Андрея Владимировича безусловно актуальна, поскольку посвящена использованию этой технологии для создания растений картофеля, устойчивых к вирусной инфекции. С применением нового (бесплазмидного) подхода для доставки редактирующего комплекса в растительные клетки соискателем показана возможность создания в относительно короткие сроки линий растений картофеля с редактированным растительным геном, которые обладают резистентностью к одному из наиболее опасных и экономически важных вирусных патогенов картофеля – вирусу картофеля Y (YBK) и повышенной толерантностью к некоторым абиотическим стрессам.

Диссертационная работа построена по обычному плану и содержит разделы "Введение", "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты и обсуждение", "Выводы", "Список сокращений" и "Список

"литературы", который включает в себя 177 источников. Работа содержит 4 таблицы и 28 рисунков на 91 странице.

Во "Введении" определены основные цели и задачи работы и аргументированы её актуальность и новизна, теоретическая и практическая значимость.

Обзор литературы посвящен разнообразным аспектам использования системы CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к патогенам. В начале обзора литературы автор кратко останавливается на основных стратегиях, используемых в растениеводстве для борьбы с инфекционными патогенами - традиционная селекция, получение трансгенных растений, фитосанитария, оздоровление семенного материала, обосновывает актуальность и перспективность использования новых технологий редактирования генома для генерации растений, устойчивых к различным инфекциям.

В следующем разделе автор кратко приводит известные данные об организации и функционировании CRISPR как системы молекулярного иммунитета прокариот, излагает историю открытия CRISPR в ДНК эукариот, разработок по созданию на основе CRISPR-Cas различных платформ для редактирования генома. Хромов излагает сведения об эволюционной классификации систем CRISPR-Cas, обосновывает преимущества и популярность систем класса 2 типа 2 (cas9) как основы для создания инструментов целевого редактирования генома, характеризует CRISPR/Cas системы редактирования РНК.

Последующие разделы обзора посвящены использованию систем CRISPR/Cas для создания вирусоустойчивых растений. Здесь Хромов верно выделяет два основных подхода в такого рода разработках - прямое подавление вирусов или получение вирусоустойчивых растений-хозяев за счет мутации их генов «восприимчивости». Возможности и ограничения первого подхода автор наглядно описывает на примерах работ, направленных

доставки генов и компонентов редактирующего комплекса в клетки растений, хитозана как перспективный реагента для получения таких платформ.

В целом обзор производит приятное впечатление, он неплохо структурирован, информативен, наглядно иллюстрирован различными рисунками и схемами. Изложенные в Обзоре данные логически подводят к цели и задачам экспериментальной работы, представленной соискателем.

В разделе "Материалы и методы" описано большое количество различных методов, использованных автором в настоящей работе. Следует отметить, что ряд методов изложен недостаточно подробно, что, однако, не сильно влияет на принципиальную воспроизводимость данной работы.

Результаты проведённых исследований изложены достаточно чётко и последовательно в пяти главах. Первая глава посвящена конструированию коротких гидовых РНК (кгРНК) для редактирования двух генов картофеля, мишней настоящей работы, а именно гена фитоен десатуразы и гена коилина и включает дизайн кгРНК, их *in vitro* синтез и оценку активности. Дополнительно проведен анализ *in vitro* активности одной из кгРНК при модификации её последовательности путем внесения нуклеотидных замен в последовательность участка кгРНК, взаимодействующего с протоспейсером, и участка, расположенного непосредственно за РАМ-сайтом. Полученные данные не позволяют понять какие особенности структуры кгРНК, определяют ее роль в активности эндонуклеазы Cas9 при внесении разрывов в геномную ДНК картофеля, но несомненно указывают на необходимость обязательного предварительного *in vitro* тестирования кгРНК, предсказанных биоинформатически.

Во второй главе соискатель описывает разработку нового способа доставки в клетки растений *Nicotiana benthamiana* и *Solanum tuberosum* платформ на основе микрочастиц хитозана с иммобилизованными на их поверхности модельными белками и короткими РНК методом инфильтрации

на подавление инфекций, вызываемых ДНК-содержащими вирусами – геминивирусами, каулимовирусами, парапетровирусами.

Наиболее разрушительные потери урожая у широкого спектра важных сельскохозяйственных культур вызывают РНК-содержащие вирусы растений. Поэтому вполне оправдано то внимание, которое автор уделяют возможностям использования нацеленных на РНК Cas эндонуклеаз, таких как FnCas9 или Cas13 для подавления инфекций, вызываемых тобамовирусами, потивирусами, бромовирусами. Как справедливо отмечает автор, такие подходы требуют постоянной экспрессии компонентов CRISPR/Cas системы, что возможно лишь за счет создания трансгенных растений, использование которых в сельском хозяйстве регулируется жесткими нормативными ограничениями.

Более свободными от регуляторных ограничений представляются подходы, основанные на CRISP/cas опосредованной направленной модификации генов, регулирующих устойчивость растений или чувствительность к вирусным инфекциям, например за счет внесения мутаций в ген фактора инициации трансляции eIF4E. Хромов приводит примеры получения таких растений (огурец, арабидопсис), устойчивых к потивирусам, отмечая, что и в это случае для получения «чистых» растений необходима сложная и длительная процедура избавления от CRISPR/cas трансгена за счет скрещивания.

Привлекательной альтернативой трансгенозу являются способы доставки компонентов CRISPR/Cas в клетки растений, не предусматривающие интеграцию кодирующих ДНК. Хромов перечисляет известные примеры таких систем – агробактериально-опосредованный перенос генов, трансфекция протопластов, доставка с помощью фитовирусного вектора, биобаллистическая доставка с использованием наночастиц, останавливается на особенностях каждого из подходов.

В завершающих разделах обзора автор более детально характеризует преимущества функционализированных нано/микрочастиц как средств

в клетки растений. Результаты, полученные в этом разделе, защищены патентом, а предложенный метод использован соискателем для доставки комплексов Cas9/кгРНК при редактировании генов картофеля.

Третья глава посвящена редактированию гена картофеля, использованного в качестве модельного, а именно редактированию гена фитоэн десатуразы. Этот кодирует фермент вовлечен в процессы биосинтеза каротиноидов, и его дефицит приводит к депигментации растений. Таким образом, оценка эффективности геномного редактирования может быть проведена первоначально на основании визуальной оценки растений (побеления листьев). Важно отметить, что в диссертации впервые для редактирования использованы клетки меристемы, технология получения и последующей регенерации которых в целые растения хорошо отработана для получения безвирусных растений картофеля. Существенно, что уже при редактировании модельного гена были выявлены все особенности, характерные для использованных методов бесплазмидной доставки редактирующего комплекса – метода вакуумной инфильтрации микрочастиц хитозана и известного метода бомбардмента микрочастицами золота, функционализированных комплексом Cas9/кгРНК в клетки меристемы. К их числу относятся относительно низкая эффективность, затрагивающая до двух аллелей гена тетраплоидного картофеля, быстрое (до 2-х месяцев) получение редактированных линий растений и наконец, что особенно интересно, характеристики собственно изменений вносимых в целевой ген. Соискатель показал, что бесплазмидное редактирование клеток меристемы приводит к появлению протяженных делеций в несколько сотен нуклеотидов в редактируемом гене, а не традиционных инделей (короткие вставки/делеции) в редактируемой последовательности.

В четвертой главе раздела «Результаты и обсуждение» проведено редактирование гена коилина, основного структурного белка субъядерных телец Кахаля, дефицит которого в растениях, как показано ранее на модельных растениях *N. benthamiana*, может повышать устойчивость

растений к некоторым вирусным инфекциям и абиотическому (солевому) стрессу. Показано, что первоначальное редактирование комплексом Cas9/кгРНК сопровождается редактированием только одного аллеля гена из четырех. Повторное редактирование приводит к появлению двух дополнительных редактированных аллелей. Результатом редактирования являются не короткие вставки/делеции, а протяженные делеции в среднем от 400 до 600 пн. В этом разделе дано наиболее детальное и обширное обсуждение соискателем плюсов и минусов (в основном плюсов) метода бесплазмидного редактирования меристем, представленного в диссертационной работе.

В пятой главе раздела приводятся данные функционального анализа роли гена коилина в устойчивости редактированных линий растений картофеля к инфекции Y вирусом картофеля (YBK) и абиотическим стрессам. Интересно, что даже редактирование одного аллеля гена коилина приводит к заметному эффекту в повышении резистентности редактированных линий к заражению YBK и возрастанию толерантности к осмотическому и солевому стрессам. Повышенную устойчивость к заражению YBK демонстрировали и редактированные линии в полевых условиях на естественном фоне. Важно отметить, что повторно редактированная линия характеризовалась практически тем же уровнем устойчивости, что и первично редактированная. Возможно, что объяснение, предложенное соискателем, о предпочтительном редактировании активно транскрибуемых локусов ДНК в клетках меристем, поддерживается этими данными.

Сказанное позволяет заключить, что представленные в диссертационной работе результаты исследований проведены на современном экспериментальном уровне с использованием широкого круга методов молекулярной биологии, биоинформатики и др. Выводы работы обоснованы и соответствуют полученным данным, результаты опубликованы

в 5 статьях в российских и международных журналах. Следует отметить, что в большинстве статей Хромов А.В. является первым автором. Материалы работы представлены на 4-х международных и российских конференциях.

В ходе проведённых исследований был получен ряд принципиально новых данных, указывающих на новизну и научно-практическую значимость работы в целом. Данные, полученные в ходе диссертационной работы Хромова А.В., дополняют представления о молекулярных механизмах редактирования растительного генома, в частности, впервые получены данные о возникновении протяженных делеций в редактируемом гене при использовании клеток меристемы картофеля и метода безплазмидной доставки компонентов редактирующей системы CRISPR/Cas9. Оптимизация предложенной технологии редактирования представляется перспективной для более простого и быстрого получения устойчивых к абиотическим и биотическим стрессам сортов картофеля (а может быть и других культур) исключающих создание генно-модифицированных растений.

В целом диссертация хорошо написана, сделанные выводы обоснованы, однако есть ряд замечаний по оформлению работы. В работе встречается небольшое количество опечаток. Как уже упоминалось выше в разделе «Материалы и методы» часть методов описана недостаточно подробно. В частности, стоило бы отдельным пунктом указать происхождение коммерческого препарата использованной в работе рекомбинантной Cas9 нуклеазы (кат.номер, концентрация белка), условия получения РНК-комплексов (соотношение cas9/кгРНК) и наночастиц хитозана с РНП. По непонятной причине в работе нет сквозной нумерации страниц, таблиц и рисунков. В подписях к некоторым рисункам встречаются одновременно мелкий текст и некоторая пикселизация, что затрудняет прочтение.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени

М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.03 – «молекулярная биология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Хромов Андрей Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент: кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы генетической инженерии грибов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук, Институт Биоинженерии

Эльдаров Михаил Анатольевич

Контактные данные.
тел.: +7 (499) 135-62-19;
e-mail: meldarov@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена кандидатская диссертация: 03.00.03 – «Молекулярная биология»

Адрес места работы:

117312, Москва, Россия, Проспект 60-летия Октября д. 7, корп.1
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской Академии Наук, Институт Биоинженерии
Тел.: +7 (495) 954-52-83
e-mail: info@fbras.ru

Подпись сотрудника ФИЦ Биотехнологии РАН М.А.Эльдарова удостоверяю:

Зам. начальника отдела кадров

И.Н.Шиян