

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Соловьева Александра Александровича на диссертационную работу Хромова Андрея Владимировича на тему: «Бесплазмидное редактирование генома растений картофеля системой CRISPR/Cas9», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Диссертационная работа Хромова Андрея Владимировича посвящена применению технологии CRISPR/Cas9 для получения устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам линий картофеля путем прямой доставки редактирующего комплекса в клетки растения, так называемым бесплазмидным способом. Данный подход позволяет создавать линии картофеля с измененными целевыми генами с использованием инструментов генной инженерии, исключая получение трансгенных растений (генно-модифицированных организмов, ГМО).

Актуальность работы определяется запросом практического растениеводства на современные молекулярные методы, позволяющие относительно быстро и просто создавать сорта растений с улучшенными характеристиками, но без получения ГМО, использование которых запрещено законодательством многих стран.

Задачи работы предусматривали:

1. Разработку способа 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 инфильтрации в клетки растений.

2. Отработку условий 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 проведение редактирования двух генов – гена *PDS* и гена коилина.

4. Проведение функционального анализа гена коилина в устойчивости отредактированных линий растений картофеля к инфекции Y вирусом картофеля (YBK) и абиотическим стрессам.

Работа изложена на 91 странице машинописного текста и построена по традиционному плану. Диссертация состоит из «Введения», «Обзора литературы», описания «Материалов и методов» исследования, «Результатов и обсуждения», «Выводов», «Списка литературы» из 177 наименований и включает 4 таблицы и 28 рисунков.

Во Введении автор останавливается на актуальности и научной новизне темы диссертации, формулирует цели и задачи диссертации, приводит данные о научной значимости и практической ценности результатов, методологии и методах исследований, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и результаты апробации работы и список публикаций по теме исследования.

Обзор литературы посвящен истории открытия системы CRISPR/Cas и ее применения для создания устойчивых к вирусным инфекциям растений, а также способам и специфике доставки компонентов этой системы в растительные клетки. В начале обзора автор кратко характеризует актуальные проблемы растениеводства в современных условиях возрастающего воздействия разнообразных стрессов (как биотических, обусловленных атакой различных патогенов, так и абиотических, связанных с изменениями климата) на урожайность и качество сельскохозяйственной продукции. Описывает возможности системы CRISPR/Cas обеспечить новый эффективный подход для решения этих проблем и, в частности, для создания растений, устойчивых к вирусным инфекциям.

В Обзоре кратко описана история открытия системы CRISPR/Cas и возможности ее применения для редактирования целевых генов в зависимости от свойств конкретных белков Cas. Последующие разделы обзора посвящены подробному описанию исследований, посвященных созданию растений, устойчивых к вирусам, как путем воздействия непосредственно на геном вируса (как для ДНК-содержащих, так и для РНК-содержащих вирусов), так и посредством редактирования генов самого растения. В заключительной части автор более детально останавливается на конкретных способах доставки компонентов системы CRISPR/Cas в клетки растений. Завершает Обзор раздел, посвященный свойствам хитозана и перспективам его использования для создания нано- и микроплатформ для доставки эндонуклеазы Cas9 и гидовой РНК в клетки. В целом обзор производит приятное впечатление, он хорошо структурирован, информативен, удачно предваряет экспериментальную часть работы.

Глава «Материалы и методы» содержит перечень современных методов молекулярной биологии, используемых автором. Знакомство с этим разделом диссертации убеждает в высоком экспериментальном уровне данной работы.

Экспериментальная часть диссертации, хотя и компактная по объему, убедительно демонстрирует значимость, проведенной соискателем работы от дизайна последовательностей гидовых РНК, выбора генов растения как целей редактирования и разработки платформ для доставки компонентов системы CRISPR/Cas в клетки растений до создания отредактированных линий растений, их молекулярной характеристики и описанию их свойств. Существенно, что вся работа была проведена с использованием не модельных растений, а растений картофеля, важной сельскохозяйственной культуры.

В первой части исследования автор изучил возможность получения коротких гидовых РНК (кгРНК) для генов картофеля - фитоен десатуразы и коилина. Полученные данные свидетельствуют о том, что не все теоретически предсказанные кгРНК «работают», т.е. разрезают целевой фрагмент гена, на практике *in vitro*. Далее автор проводит опыт с кгРНК, у которой по два

нуклеотида были замещены на вырожденные, а также исследует взаимодействие белка cas9 с участком за РАМ.

На следующем этапе автором изучена возможность использования микрочастиц хитозана как платформы для доставки белка и РНК в клетки растений. Показана высокая эффективность этого способа доставки. Важно отметить, что результаты, полученные в этой части работы, защищены патентом.

Основная часть диссертации посвящена редактированию двух генов картофеля – гена фитоеен десатуразы, который использован как модельный ген для обработки метода доставки редактирующего комплекса, поскольку результат его редактирования мог быть оценен визуально по побелению листьев растения, и гена коилина, для которого ранее были получены данные об его роли в устойчивости модельных растений *N.benthamiana* к заражению вирусами и абиотическому стрессу. В этой части работы надо особо отметить новизну объекта – ткани растения, использованной для редактирования. Предложено редактировать клетки меристемы картофеля, технология получения которых и дальнейшей регенерации в растения рутинно используется в процессе оздоровления сортов картофеля от вирусов. Бесплазмидная доставка редактирующего комплекса в клетки меристемы картофеля с использованием метода бомбардмента микрочастицами золота или методом вакуумной инфльтрации микрочастицами хитозана с сорбированным на поверхности частиц рибонуклеопротеидным комплексом эндонуклеаза Cas9/кгРНК приводила к редактированию от одного до двух аллелей из четырех в обоих генах. Факт редактирования гена оценивали по изменению фенотипа растения (для гена фитоеен десатуразы), по снижению уровня экспрессии гена методами ОТ-ПЦР или РВ-ПЦР, а также на основании результатов генотипирования. Для изучения возможности повышения эффективности редактирования соискатель провел повторное редактирование отредактированной линии, что действительно привело к увеличению числа отредактированных аллелей до трех.

Интересные данные получены о характере вносимых в ген модификаций. Соискатель не обнаружил типичных инделей в редактируемой последовательности, выявляемых при редактировании протопластов, клеток каллуса и колиоптелей картофеля. Вместе с тем им были выявлены протяженные делеции, длину которых удалось оценить только с помощью метода NGS. В случае обоих генов длина этих делеций составляла несколько сотен пн (в среднем от 400 до 600 пн), а начало делеций локализовалось за 3 нуклеотида до PAM-сайта. Вероятная причина возникновения подобных делеций – высокая митотическая активность клеток меристемы.

Заключительная часть посвящена изучению устойчивости отредактированных по гену колина линий картофеля к инфекции Y вирусом картофеля и двум абиотическим стрессам (осмотическому и солевому). Редактированные линии были существенно более устойчивы к изучаемым стрессам, чем контрольные нередактированные растения. Испытания полученных линий в полевых условиях на естественном инфекционном фоне также показали большую устойчивость к вирусной инфекции и большую урожайность.

На основании полученных результатов и их подробного обсуждения автор формулирует 6 выводов, обоснованных представленными экспериментальными данными и не противоречащих данным научной литературы.

В ходе работы автором получен ряд результатов, отличающихся несомненной новизной:

1. Разработан 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 с помощью инфильтрации комплексов в листья растений. Показано, что наноплатформы способны доставлять биомолекулы в клетки эпидермиса листьев растений.

3. Оработаны 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 делящиеся клетки апикальных зон, выделенных 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 редактированных линий использовали визуальную оценку растений-регенерантов и данные ОТ-ПЦР (ген фитоеен 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 редактированных линиях картофеля по генам фитоеен десатуразы и коилина показано, что редактирование генома клеток меристем сопровождается появлением протяженных делеций размером в среднем от 400 до 600 п.н.

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 редактированных линий, выращенные в полевых условиях, проявили повышенную резистентность к заражению YBK на естественном фоне, эффективнее развивались и отличались повышенной продуктивностью.

Анализ диссертации Хромова А.В. позволяет заключить, что эта работа представляет собой законченное экспериментальное исследование, выполненное на высоком современном теоретическом и методическом уровне с

привлечением разнообразного арсенала приемов и подходов молекулярной биологии и обладающая несомненной новизной. Автором отработана простая и достаточно эффективная технология, позволяющая получать растения с улучшенными характеристиками, не относящиеся к ГМО, с помощью бесплазмидной доставки редактирующего комплекса Cas9/кРНК в клетки меристемы. В диссертационной работе Хромова А.В. представлены данные, имеющие фундаментальное значение и перспективные для практического применения.

Все экспериментальные положения работы подробно документированы. Достоверность и обоснованность результатов и выводов, их новизна и актуальность независимо подтверждены многочисленными публикациями в научных журналах, сообщениями на престижных международных конференциях. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации и публикациям.

В то же время по работе возник ряд вопросов и замечаний:

1. Чем обусловлен выбор сорта Чикаго для проведения редактирования?

2. В тексте присутствуют опечатки и странности в оформлении – например, в оглавлении отсутствует ссылка на главу «Обзор литературы». Часть изображений микроскопии плохо оптимизирована для печати. Часть подписей к рисункам оторваны от них.

3. Есть некоторые вопросы и к полевому опыту: какого возраста взяты растения контрольного и опытных вариантов, были ли использованы в качестве контроля оздоровленные незараженные растения, кроме того, на графиках нет данных о заражении на начальный период и отсутствуют данные статистической обработки.

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: доктор биологических наук, в профессор РАН, заведующий лабораторией маркерной и геномной селекции растений, заместитель директора по научной и образовательной деятельности Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

Соловьев Александр Александрович

Контактные данные:

тел.: +7 (499) 976-65-44

e-mail: soloviev@iab.ac.ru

Специальности, по которым официальным оппонентом защищена диссертация на соискание степени доктора биологических наук:

03.02.07 – Генетика и 06.01.05 Селекция и семеноводство

Адрес места работы:

127550, Москва г, Тимирязевская ул, 42

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

Тел.: +7 (499) 976-65-44

e-mail: iab@iab.ac.ru

Подпись А.А. Соловьева заверяю: заца

Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ

Е.И. Федина