

ОТЗЫВ

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

Вирусы наносят значительный ущерб растениеводству, снижая урожайность и ухудшая качество продукции различных сельскохозяйственных культур. Для борьбы с вирусными инфекциями в настоящее время используют несколько основных подходов. Первый основан на использовании генов природной устойчивости к вирусам в традиционной селекционной работе. Во-вторых, предпринимаются попытки создания устойчивых к вирусам трансгенных растений на основе механизмов РНК-интерференции и посттранскрипционного у молкания генов, а также путем трансгенной экспрессии клеточных генов природной устойчивости. Одним из самых распространенных является подход, основанный на отборе безвирусных растений или их получении путем вычленения из зараженных растений апикальных меристем, свободных от вирусов, с последующим размножением безвирусных растений при постоянном вирусологическом контроле с помощью высокочувствительных методов диагностики. Эффективность оздоровления может быть повышена путем предварительной термотерапии зараженных растений и выращивания меристемных растений на среде с ингибитором вирусов. Каждый из упомянутых подходов имеет свои существенные ограничения, поэтому разработка новых приемов создания противовирусной устойчивости по-прежнему остается актуальной задачей.

В диссертационной работе А.В. Хромова успешно решена задача создания растений картофеля, устойчивых к заражению вирусом Y картофеля (PVY), путем редактирования их генома с помощью системы CRISPR/Cas. Геномное редактирование с использованием системы CRISPR/Cas является новейшей и, по-видимому, перспективной технологией для решения такого рода задач. Автором реализован подход, основанный на редактировании генов растения-хозяина, продукты которых играют важную роль в вирусной инфекции и редактирование которых может препятствовать репликации или транспорту вируса.

Соискателем разработаны редактирующие комплексы (РК), состоящие из короткой гидовой РНК (кгРНК) и рекомбинантной эндонуклеазы, а также система оценки их эффективности и специфичности *in vitro*. Разработан новый способ доставки этих комплексов в клетки растений с помощью вакуумной инфильтрации функционализированных микрочастиц хитозана. У картофеля мишенями для

редактирования являлись гены фитоендесатуразы и коилина. Первый ген выбран в качестве модельного объекта, позволяющего визуально отслеживать эффективность редактирования; коилин вовлечен в процесс вирусной инфекции. Установлено, что редактирование генома клеток меристем картофеля сопровождается появлением в целевых генах делеций размером от 489 до 574 пар нуклеотидов. Редактированные по гену коилина растения отличались повышенной устойчивостью к заражению YBK, а также к осмотическому и солевому стрессам. Таким образом, поставленные задачи были успешно решены. Следует отметить целостность работы: она включает все необходимые стадии, которые логически вытекают одна из другой - от получения РК до характеристики вызываемых ими эффектов.

Диссертационная работа построена по традиционному плану и содержит разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы», насчитывающий 177 источников. Работа изложена на 91 странице текста и иллюстрирована 28 рисунками и 3 таблицами, из которых к экспериментальной части работы относятся 22 рисунка и 1 таблица. Сравнительно небольшой объем диссертационной работы не препятствует ее пониманию, потому что текст информационно насыщен, логично организован, большое количество рисунков существенно облегчают его восприятие. Непонятно, однако, по какой причине в тексте диссертации отсутствует сквозная нумерация рисунков и таблиц.

Во «Введении» обоснована актуальность выбранной темы, четко определены цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы изложена история открытия системы CRISPR/Cas у прокариот и проанализирована ее роль в бактериальном иммунитете. Основное внимание уделено характеристике элементов системы CRISPR/Cas как перспективного инструмента редактирования генома эукариот, в том числе для создания растений, устойчивых к вирусам. Проведено сравнение методов доставки компонентов CRISPR/Cas в клетки растений. В частности, описаны свойства хитозана как платформы для биологически активных макромолекул. Таким образом, в обзоре с достаточной полнотой представлен и проанализирован материал, необходимый для понимания и оценки результатов, полученных в ходе работы. Обзор литературы показывает, что соискатель свободно владеет предметом исследований, что подтверждается и его соавторством в обзорах по соответствующей тематике, опубликованных в журналах «Биохимия» и «Phytopathology».

По разделу "Материалы и Методы" есть замечания редакционного характера. В описании процедуры ПЦР и ОТ-ПЦР (3.2.14, 3.2.15), генотипирования (3.2.21), глубокого секвенирования (3.2.22) упущены многие важные детали. Не сказано, каким образом проводили тестирование растений картофеля, из которых вычленили меристемы, на наличие PVY.

В разделе "Результаты и Обсуждение" последовательно описаны все стадии работы и полученные результаты.

Работа по созданию РК состояла из рационального подбора последовательностей, комплементарных потенциальному сайту редактирования, синтеза и наработки соответствующих кгРНК, изучения возможности повышения их активности путем внесения нуклеотидных замен в различные участки кгРНК. Результаты, полученные в этой части работы, могут иметь и практическое, и теоретическое значение, поскольку расширяют наши представления об особенностях структуры РК, влияющих на эффективность редактирования.

Для доставки РК в клетки впервые в качестве носителя использованы микрочастицы хитозана. Новый способ защищен патентом. Показано, что новый метод доставки по меньшей мере не уступает в эффективности бомбардменту частицами золота, функционализированными РК. Остается, однако, неясным, почему молекулы хитозана, аминогруппы которого экранированы полифосфатом, сохраняют способность связывать молекулы РНК.

Хорошим решением является выбор клеток меристем для редактирования. Возможно, в быстро делящихся клетках меристемных тканей ядерная оболочка не всегда успевает сформироваться, что облегчает доступ РК к хромосомам и повышает эффективность процесса редактирования. Кроме того, нельзя не согласиться с соискателем, что преимуществом этой мишени является простота регенерации меристем в целые растения, что широко используется в производстве безвирусного картофеля. Таким образом, новый способ создания противовирусной устойчивости может быть органично вписан в существующую технологию оздоровления сельскохозяйственных растений от вирусов с помощью апикальных меристем и повысить ее эффективность.

Показано, что результатом редактирования целевых генов фитоендесатуразы и коилина является образование протяженных (несколько сот пар оснований) делеций по крайней мере в некоторых аллелях, что приводит к снижению активности соответствующих генов и угнетению вирусной инфекции в растениях картофеля. Возникновение делеций было установлено с помощью высокопроизводительного

секвенирования. К сожалению, в работе не представлены результаты выравнивания прочтений, демонстрирующие наличие делеций. Кроме того, мне представляется, что наличие протяженных делеций можно было выявить при анализе соответствующих продуктов ПЦР с помощью электрофореза в геле агарозы и последующего секвенирования по Сэнгеру продуктов ожидаемого размера и значительно более коротких продуктов.

Редактированные растения картофеля механически инокулировали вирусом для проверки их устойчивости к заражению. Последующее тестирование зараженности с помощью ОТ-ПЦР показало, что выключение даже одного аллеля гена коилина приводит к уменьшению доли заразившихся растений, т.е. цель работы оказалась достигнута. Однако осталось несколько методических вопросов по этому этапу работы. Так, у инокулированных взрослых растений тотальную РНК выделяли из системных *симптоматических* листьев (стр. 70). Если действительно для анализа брали только листья с симптомами, а бессимптомные листья игнорировали, то такой прием является технической ошибкой, которая могла повлиять на результат определения зараженности. Кроме того, не указана последовательность праймеров для определения PVY в ОТ-ПЦР, нет ссылки на эти праймеры, если они были взяты из литературных источников, не приведены условия ПЦР.

Логично, что редактированные пробирочные растения картофеля были высажены в поле на естественном инфекционном фоне. Вновь оказалось, что редактированные растения слабее заражаются вирусом. В полевых условиях PVY мог быть привнесен только тлями. Этот результат показывает, что устойчивость к заражению PVY у редактированных растений картофеля может развиваться не только в клетках эпидермиса, но и в клетках мезофилла, сосудов и т.д., т.е. именно в тех клетках, в которые вирус проникает при инокуляции тлей. Это предположение, видимо, подтверждается обнаружением модельных комплексов в клетках мезофилла и проводящего пучка в растениях *N. benthamiana* (рис. 5 – 7). Такой результат может оказаться очень важным в практическом плане, поскольку в полевых условиях именно вирофорные тли являются главным источником вируса. К сожалению, в описании условий полевого опыта (рис. 19) много неясного. Во-первых естественный инфекционный фон (т.е. доля зараженных PVY растений картофеля вне экспериментальной делянки и наличие/количество переносчиков) никак не охарактеризован. Солидная доля заразившихся контрольных растений (64%) указывает на то, что этот фон был очень высок, или наблюдался массовый лет тлей, или имело место сочетание обоих факторов. Во-вторых, за две недели (с 30 по 45 день после

высаживания в поле) наблюдался отчетливый прирост количества зараженных растений в опыте и в контроле. Причины, по которым тестирование после 45 дня было прекращено, не указаны. Между тем, в опытах по редактированию гена фитоендсатуразы было установлено, что визуально наблюдаемый эффект от редактирования (побеление листьев) транзитoren; можно предположить, что устойчивость к заражению PVY также имеет временную зависимость. Поэтому тестирование зараженности следовало продолжать до последней возможности.

Выводы работы обоснованы полученными результатами. Автореферат полностью отражает основные данные, полученные в диссертационной работе. Результаты опубликованы в известных российских и зарубежных журналах. Особо следует отметить публикацию в журнале *Phytopathology* - одном из самых авторитетных изданий по фундаментальным проблемам фитопатологии и болезней растений.

Приведенные выше замечания не умаляют значимости диссертационного исследования, не ставят под сомнение выводы и положения, выносимые на защиту, а, возможно, окажутся полезными для совершенствования нового и, безусловно, перспективного метода создания сельскохозяйственных растений, устойчивых к вирусным инфекциям, путем геномного редактирования. 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, и оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Соискатель Хромов Андрей Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент: доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры вирусологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Чирков Сергей Николаевич

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-56-26;

e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

Специальности, по которым официальным оппонентом защищена докторская диссертация: 03.00.06 – «Вирусология»; 03.00.23 - "Биотехнология".

Адрес места работы:

119234, Москва, Россия, Ленинские Горы д. 1, стр.12,

Биологический факультет ФГБОУ ВО МГУ имени М.В.Ломоносова.

Тел.: +7 (495) 939-53-59

e-mail: fxb@genebee.msu.su

Подпись сотрудника биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

С.Н. Чиркова удостоверяю:

Заведующая канцелярией

Н.Н.Сидорова