**ВІДГУК**

офіційного опонента **Циганкової Вікторії Анатоліївни**

на дисертаційну роботу **Секан Альони Сергіївни«Використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/*lox*P для одноетапного отримання трансформантів *Arabidopsis thaliana*, вільних від маркерних послідовностей»**,

подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

**Актуальність теми.** Використання рекомбіназ в генетичній інженерії є досить новою та перспективною технологією. Серед розроблених стратегій видалення селективних чи маркерних послідовностей з геномів трансформованих рослин найбільшою популярністю користується саме сайт-специфічна рекомбіназна система, тому що її використання дозволяє значно покращити отримання трансформованих ліній рослин. Перевагою рекомбіназної системи Cre/*lox*P є те, що під час роботи фермент не потребує присутності додаткових факторів ініціації. Окрім цього, сайт-специфічна рекомбіназна технологія дозволяє отримувати однокопійнітрансгенні лінії, що є важливим з практичної точки зору, оскільки доведено, що за наявності єдиної копії Т-ДНК рівень її експресії в геномі підвищується.

Для досягнення конститутивної експресії рекомбінази у трансформантів загалом використовують такі підходи, як почергова трансформація генома рослин векторними конструкціями з геном інтересу та геном самої рекомбінази або перехресне запилення між трансгенними лініями, які експресують рекомбіназу. У даному випадку видалення маркерних чи селективних послідовностей ускладнюється за умови трансформації рослин з вегетативним розмноженням та рослин з подовженим часом відтворення. Окрім цього, в трансформантах через деякий час після події трансформації спостерігаються фенотипові та генетичні зміни, котрі пов’язують з конститутивною експресією рекомбінази Cre. Альтернативним варіантом отримання трансгенних ліній, вільних від маркерних послідовностей, є транзієнтна експресія ферменту, однак при застосуванні такого підходу необхідно здійснювати додаткові етапи трансформації. Як варіант, транзієнтну експресію поєднують з автоексцизією, коли маркерні чи селективні гени та ген рекомбінази фланкуються сайтами ексцизії. У такому випадку відбувається видалення гена рекомбінази, що й зумовлює транзієнтну експресію ферменту в трансгенному організмі. Результат досягається шляхом комбінації позитивних та негативних маркерних генів у трансформуючій касеті, що, в свою чергу, ускладнює процес трансформації.

Викладені вище факти фокусують увагу саме на перспективності використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/*lox*P, як ефективного молекулярно-генетичного інструменту для вирішення цього питання. Відповідно, одним із найважливіших шляхів розв’язання подібного завдання є створення векторних конструкцій, котрі б дозволили оптимізувати процес генетичної трансформації за умов використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/*lox*P та отримати вільні від СМГ трансгенні рослини всього за один етап селективного відбору.

Дисертаційна робота виконувалась в рамках двох науково-дослідних тем відділу геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», а також під час стажування в рамках Програми академічних обмінів імені Фулбрайта в Україні впродовж 2011–12 рр.

**Наукова новизна одержаних результатів**. Розроблено дизайн та створено ДНК-конструкції з комбінацією генетичних послідовностей, таких як ген gus, nptII, та cre, розташованих в межах сайтів ексцизії, а також сайт-специфічною рекомбіназною системою Cre/loxP. Встановлено, що при використанні цих конструкцій після події інтеграції Т-ДНК до генома рослин вже в першому поколінні трансформантів *A. thaliana* відбувається автоексцизія loxP-обмежених ділянок Т-ДНК. Вперше продемонстрована висока ефективність розробленого для агробактеріальної трансформації *A. thaliana* методу занурення квіток із залученням синтезованих векторних конструкцій. Встановлено, що в результаті використання запропонованих ДНК-конструкцій із залученням рекомбіназної системи Cre*/lox*P як молекулярно-генетичного інструменту вдається досягти присутності однієї копії Т-ДНК на геном трансформантів. Вперше отримано трансгенні рослини без використання індуцибельних або тканино-специфічних промоторів до складу трансформуючих ДНК-конструкцій, що дозволило значно спростити процес генетичної трансформації рослин, знімаючи питання створення специфічних умов для селективного відбору трансгенного матеріалу чи залучення додаткових хімічних агентів. Запропоновано статистичну класифікаційну модель оцінки ефективності трансформації рослин, отриманих за допомогою створених ДНК-конструкцій із залученням сайт-специфічної системи Cre/*lox*P.

**Практичне значенняодержаних результатів.** Отримані дисертантом результатимають важливезначення як для фундаментальних, так і прикладнихнапрямівбіотехнології рослин. Дисертантомрозроблено новий підхід для одноетапного отримання трансгенних рослин за допомогою векторних конструкцій із сайт-специфічною системою Cre/*lox*P, щоє вирішенням проблеми зниження потенційних ризиків від вивільнення ГМ рослин у навколишнє середовище. Автором роботи доведено, що в результаті використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/*lox*P у розроблених ДНК-конструкціях, значно спрощується процес трансформації.Дисертантом розроблена статистична класифікаційна модель завдяки якої стає можливим передбачити ефективність використання розроблених векторних ДНК-конструкцій на інших рослинних об’єктах.

Таким чином, результати досліджень можуть бути використані у практиці біотехнології для розроблення стратегії генетичної трансформації однодольних та дводольних рослин.

**Повнота викладу основних наукових положень та висновків у опублікованих наукових працях**. За темою дисертації опубліковано 9 наукових праць, з них 7 статей в наукових фахових виданнях згідно переліку МОН України, та 2 тез наукових конференцій.

**Структура дисертації**. Дисертація складається з вступу, трьох розділів, заключної частини, висновків, списку літератури, додатків. Матеріали дисертації викладені на 142 сторінках друкованого тексту, містять 21 рисунок, 7 таблиць і два додатки. Список використаних джерел включає 234 найменування.

**У вступі**вельми детально обґрунтовано актуальність теми, чітко сформульовано мету і завдання дослідження, наукову новизну і практичне значення отриманих результатів, відмічено особистий внесок дисертанта у виконання роботи.

**Вогляді літератури** дисертантом окреслено основні шляхи видалення маркерних послідовностей ДНК з геному трансформантів на сьогоднішній день, а саме: технологія котрансформації, векторна система мультиавтотрансформації, використання транспозонів, гомологічна рекомбінація. Також здобувачдуже детально аналізує сучасний стан і перспективи використання технології сайт-специфічних рекомбіназних систем в цілому для отримання генетично модифікованих рослин, вільних від маркерних послідовностей. В роботі описано основні досягнення й проблеми використання селективних та маркерних генів під час створення генетично модифікованих рослин. Автором чітко доведена важливість створення нового підходу до використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/*lox*Pдля створення трансформантів, вільних від маркерних та селективних генів. В результаті здійсненої роботи дисертантом представлені дані одноетапного отримання трансгенних рослин арабідопсису, вільних від маркерних генів

У цілому в огляді літератури достатньо повно висвітлено наукові дані останніх років, які стосуються теми дисертації. Огляд свідчить про фундаментальні знання автором сучасного стану в даній галузі досліджень, спроможність дисертанта глибоко аналізувати опубліковані результати, здатність виділити і узагальнити головне з досить чималого масиву розрізнених літературних джерел, чітко викласти стан та перспективи досліджень.

**У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень»** детально наведено умови проведення досліджень і надано характеристику експериментального матеріалу. У дисертаційній роботі використано широкий спектр сучасних біологічних методів досліджень та задіяні новітні програми статистичного аналізу отриманих даних. Детально описані традиційні методи досліджень генетичної інженерії, продемонстровано створення статистичної класифікаційної моделі,за допомогою котрої вдалось виділити критичні етапи експериментальних досліджень. Ці матеріали свідчать про вільне володіння дисертантом сучасними методами досліджень біологічних об’єктів.

**У розділі3** описано отримання трансгенних рослин арабідопсису з використанням створених векторних конструкцій, котрі містять у своєму складі сайт-специфічну рекомбіназну систему Cre/*lox*P. Автор детально визначає переваги розроблених ДНК-конструкцій. За допомогою методу агробактеріальної трансформації шляхом занурення квіток з використанням створених ДНК-конструкцій дисертант демонструє одноетапне отримання генетично модифікованих ліній рослин *A. thaliana* (покоління Т0).

У результаті проведених експериментів здобувачем було встановлено, що використання 35S промотора в синтезованих векторних конструкціях забезпечує експресію маркерного гена на високому рівні. З метою уникнення ефекту мовчання генів, підтвердження присутності Т-ДНК в геномі трансформантів та виявлення можливої події рекомбіназної ексцизії в трансформантах Т0 в роботі наводяться результати молекулярно-генетичного аналізу. Автор наводить оцінку ефективності трансформації рослин покоління Т0 при порівнянні результатів молекулярно-генетичного, гістохімічного аналізу та рівня схожості насіннєвого матеріалу за умов селективного тиску.

Згідно результатів GUS-тесту, автором показано, що кількість ліній зпозитивним результатом GUS тесту становила у трансформованих кожним типом ДНК-конструкції рослин покоління Т0 приблизно 78–85%. За результатами аналізу ПЛР присутність Т-ДНК конструкцій у трансформантів покоління Т0 було виявлено у 80% рослин, трансформованих конструкцією Cre/*lox*P1 та у87% рослин, трансформованих конструкцією Cre/*lox*P2 відповідно. Різниця між отриманими результатами гістохімічного та молекулярно-генетичного аналізу може свідчити на користь мовчання інтегрованих генів.

Дисертантом із застосуванням обох типів ДНК конструкцій, що містять сайт-специфічнурекомбіназнусистемуCre/*lox*P, отримано високу кількість стійких до антибіотику ліній в наступному Т1 поколінні трансформантів. Отримані результати свідчать про експресію привнесених генів у поколінні рослин Т1.

Оскільки чутливість рослин різних видів до одного і того ж селективного агенту різниться між собою, здобувачем також наведено результати досліджень з визначення оптимальної концентрації антибіотику гігроміцину в селективному середовищі для здійснення добору трансформантів. Таким чином, автором самостійно розроблено ефективну систему селекції трансгенних ліній рослин, геном яких містить сайт-специфічнурекомбіназуCre/*lox*P, та отримано два наступних покоління трансгенних ліній (покоління Т1 таТ2).

З метою встановлення рівня експресії інтегрованої Т-ДНК в геномі трансгенних рослин покоління Т1, дисертантом наводяться результати гістохімічного аналізу. В роботі відзначено приріст ліній з негативним результатом GUS-тесту приблизно на 5–7%для кожного типу ДНК-конструкції, що на думку автора свідчить про роботу рекомбінази в наступних поколіннях трансформантів.

За допомогою блот-гібридизації за Саузерном, здобувачем підтверджено трансгенний статус досліджуваних рослин покоління Т1, а також показано мінімізацію ефекту мультикопійності привнесених Т-ДНК в геномі трансформантів за допомогою сайт-специфічної рекомбінази Cre/*lox*P.

В результаті проведеного молекулярно-генетичного та гістохімічного аналізутрансформантів покоління Т2 експериментально доведена ефективність використання розробленого підходу із застосуванням сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/*lox*P для отримання генетично модифікованих рослин *A. thaliana*, вільних від послідовностей ДНК з маркерними генами. Показано, що для векторної конструкції Cre/*lox*P1 загалом було отримано 53% та для Cre/*lox*P2 – 43% ліній рослин, вільних від маркерних генів. Для порівняння автор наводить результати інших робіт по розробленню підходів із використанням сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/*lox*P.

Автор наводить детальний статистичний аналіз отриманих даних, підкреслюючи окреме значення результатів дослідження пророщування рослин арабідопсису покоління Т1 на селективному середовищі у присутності антибіотику. За допомогою однофакторного дисперсійного аналізу даних встановлено, що різниця в розташуванні генів у двох векторних касетах з однаковим набором генів впливає на ефективність трансформації. Дисертантом доведено, що зміна розташування генів у векторних касетах обумовлює виникнення різних генетичних подій, в результаті чого було отримано трансгенні рослини з різними інтегрованими Т-ДНК.

В результаті аналізупрояву ДНК-конструкцій у трансформантах арабідопсису за допомогоюмультиваріативного методурозроблено статистичну класифікаційну модель, за допомогою котрої здобувачу вдалось виділити критичні етапи експериментальних досліджень ефективності роботи розроблених ДНК-конструкцій, що уможливлює спрогнозувати ефективність використання розроблених ДНК-конструкцій на інших рослинних об’єктах з можливістю передбачення результатів прояву Т-ДНК в майбутніх трансформантах на 60%.

В розділі **Узагальнення** здобувачем проаналізовано таузагальнено результати проведеної експериментальної роботи, поетапно описана ефективність використання розробленого підходу з сайт-специфічною системою Cre/*lox*Pдля отримання трансформантів, вільних від маркерних генів. Висвітлено перспективи використання даних векторних конструкцій в біотехнологічній практиці.

Підсумовуючи, слід підкреслити, що у цілому експериментальний матеріал викладено чітко і логічно, результати достатньо оброблено за допомогою відповідних до поставлених завдань статистичних методів, підтверджено оригінальними і якісними ілюстраціями та фотографіями, лаконічними та чіткими схемами та таблицями. Зроблені дисертантом на основі отриманих експериментальних даних висновки є логічно обґрунтованими,чітко і ясно викладеними, відповідають завданням і повністю висвітлюють наведені в дисертації результати досліджень. В цілому, критичних зауважень, які б могли суттєво вплинути на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи у мене немає.

Водночас, я хочу висловити декілька незначних зауважень та побажань, які не знижують загальну високу оцінку проведеної роботи:

1. У розділі 1 «Огляд літератури» бажано було б більш детально охарактеризувати основні шляхи видалення маркерних і селективних послідовностей ДНК та додати дані сучасних вітчизняних досліджень за подібною тематикою; детальніше розписати практику використання в сучасній біотехнології інших сайт-специфічних рекомбіназних систем з метою чіткішого окреслення актуальності використання саме рекомбіназної системи Cre/*lox*P; представити дані літератури, які свідчать про ключову роль малих регуляторних siРНК у процесі РНК залежного мовчання (сайленсингу) генів у трансгенних рослин як на транскрипційному рівні шляхом метилування ДНК та модифікації гістонів, так і на посттранскрипційному рівні шляхом РНК-інтерференції (блокування) трансляції мРНК та її наступною деградацією за спільною участю RISC комплексу.

2. У розділі «Матеріали і методи» розробка та створення використаних ДНК-конструкцій описано недостатньо.Дослідження з підбору концентрації антибіотика для селективного добору трансформантів дисертантом були здійснені на етапі покоління Т1, а не під час попереднього покоління, що є недостатньо зрозумілим.

3. У розділі 3, у підрозділі 3.1 бажано було б пояснити, чому *A. tumefaciens*-опосередковану трансформацію рослин арабідопсису проводили методом занурення квіток та описати переваги цього методу порівняно з іншими методами; у цьому ж підрозділі 3.1. на рис.3.6. автором представлена кількість ліній трансформованих кожним типом ДНК-конструкції рослин покоління Т0 з позитивними та негативними результатами GUS-тесту, що не відповідає загальній кількості ліній (100 %), чи можливо, що невраховані 10–12% рослин належать доGUS (+/-) химерно забарвлених зразків?

4. У розділі 3, у підрозділі 3.6.2. не достатньо чітко аргументовано використання робастних тестів Брауна-Форсайта та Уелша; у підрозділі 3.6.4.цього розділу аналіз виявленняДНК-конструкцій у трансформантах за допомогою мультиваріативного методу описаний не досить чітко, що ускладнює розуміння схеми його здійснення.

5.Рисунок 3.12 (Б) на с. 75 " Результати блот-гібридизації за Саузерномгеномної ДНК рослин арабідопсису покоління Т1, трансформованих ДНК-конструкцієюpORE-lox1HGC, та гібридизованих за міченою послідовністю гена *hptII* ", а також наступне пояснення до нього в недостатній мірі підтверджують зменьшеннякопійностітрансгену в геномі до однієї/декількох копій Т-ДНК в результаті роботи сайт-специфічної системи Cre/loxP. Бажано було б чітко встановити рівень присутності трансгена в геномі зразку для демонстрації сайт-специфічної рекомбіназної ексцизії, як однієї з її переваг.

6. На деяких сторінках зустрічаються друкарські або орфографічні помилки, що вказує на недостатню уважність дисертанта до викладення матеріалу дисертації.

