

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Секан Альони Сергіївни «ВИКОРИСТАННЯ САЙТ-СПЕЦІФІЧНОЇ РЕКОМБІНАЗНОЇ СИСТЕМИ Cre/loxP ДЛЯ ОДНОЕТАПНОГО ОТРИМАННЯ ТРАНСФОРМАНТІВ ARABIDOPSIS THALIANA, ВІЛЬНИХ ВІД МАРКЕРНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ», представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – Біотехнологія

Актуальність теми дисертації.

Один із актуальних напрямків сучасних біотехнологій, в тому числі й молекулярних, має відношення до фундаментальних та прикладних питань пов’язаних із отриманням нових форм рослин шляхом інтеграції в їх геном рекомбінантних молекул ДНК, здатних на генетичному рівні контролювати різноманітні процеси, зокрема пов’язаними з їх ростом, розвитком, стійкістю до несприятливих факторів довкілля. Успішному технологічному вирішенню цих питань сприяє прогрес, який досягнутий в останні десятиріччя в галузях структурно-функціональної геноміки, генетичної інженерії, теоретичних й практичних аспектів *Agrobacterium*-опосередкованої та біолістичної трансформації різноманітних видів. В даний час саме ці два способи широко використовуються при створенні біотехнологічних продуктів. При цьому, одне із ключових значень має відношення до створення ефективних векторних конструкцій, в яких для добору первинних трансгенних варіантів використовуються маркерні гени, серед яких найбільш надійними та популярними є гени стійкості до антибіотиків та гербіцидів. Однак, присутність саме таких генів в геномах трансгенних рослин викликає стурбованість світової спільноти. Тому безумовний інтерес має розробка та вдосконалення способів створення генетично модифікованих рослин, вільних від маркерних генів.

Для вирішення питань, пов’язаних із екологічною безпекою генно-інженерних продуктів, суттєвий інтерес представляють стратегії, які пов’язані з видаленням селективних чи маркерних послідовностей з геномів

трансгенних рослин. Серед них найбільшою популярністю на даний час є саме сайт-специфічна рекомбіназна система Cre/loxP, тому що під час функціонування її ключового ферменту не потрібна присутність додаткових факторів його ініціації. Не менш важливим з практичної точки зору також є те, що за наявністю єдиної копії Т-ДНК, що є характерним для Cre/loxP-системи, рівень експресії цільових генів підвищується.

Слід сказати, що для досягнення конститутивної експресії гена рекомбінази в трансгенних рослинах використовуються такі підходи, як почергова генетична трансформація рослин з використанням векторних конструкцій, що несуть ген інтересу та ген самої рекомбінази, або перехресне запилення між геном інтересу та геном самої рекомбінази.

В загалі, не викликає сумливу перспективність використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP як ефективного молекулярно-генетичного інструменту для отримання генетично модифікованих рослин. Одним із важливіших шляхів розв'язання цього завдання є створення векторних конструкцій, що дозволяють як оптимізувати процес генетичної трансформації за умов використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP, так і отримати вільні від селективних і маркерних генів трансгенні рослини всього за один етап селективного відбору.

У розділі огляд літератури представлено сучасний стан досліджень по характеристики сайт-специфічних рекомбіназних систем, їх практичного використання в молекулярний біотехнології рослин. Описані основні стратегії до застосування сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP.

У розділі матеріали і методи описано умови проведення експериментів, де дана характеристика об'єкту дослідження, умовам вирощування рослинного матеріалу, описано різноманітні поживні середовища культивування. Детально представлені питання по отриманню трансгенних рослин арабідопсису, де обговорені питання інтродукції векторних конструкцій в клітини та інтеграції Т-ДНК в геном бактерій, описаний спосіб *Agrobacterium*- опосередкованої трансформації шляхом

занурювання квіток у суспензію агробактеріальних клітин із залученням синтезованих векторних конструкцій, проведений гістохімічний аналіз бета-глюкоронідази. Значна увага була приділена молекулярно-генетичному аналізу трансгенних рослин, що включає виділення геномній та плазмідній ДНК, ПЛР-аналіз, електрофорез продуктів ампліфікації ДНК, блот-гібридізацію по Саузерну.

Основний вміст науково-дослідної роботи чітко та послідовно викладаний у розділі 3, де визначено доцільність та логіка здійснення експериментів, причому головна увага була приділена наступним ключовим питанням:

Отримання трансгенних рослин арабідопсису з використанням сайт-специфічної системи Cre/loxP. Проведений аналіз доцільності генетичної трансформації. В результаті показано, що найбільш ефективна генетична трансформація відбувалася *in planta* способом занурювання квіток. Для проведення досліджень автором розроблено 2 векторні конструкції, які в своєму складі містили одинаковий набір генів, різниця між якими полягала лише у розташуванні генів у ДНК-касеті. Причому для детального дослідження функціонування сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP у векторних конструкціях було розміщено як маркерний, так й селективний гени.

Аналіз роботи сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP в наступному поколінні трансформантів. Здійнена оцінка ефективності генетичної трансформації, яка була проведена при порівняльні результатах молекулярно-генетичного, гістохімічного аналізу та рівня схожості насіннєвого покоління за умов селективного тиску.

В результаті було встановлено, що використання конструкції Cre/loxP2 є більш ефективною ніж Cre/loxP1. В подальшому ефективність роботи сайт-специфічної рекомбінази Cre/loxP була перевірена в наступному Т1-поколінні трансформантів. Причому для аналізу рівня стабільності генетичної трансформації було проаналізовано зразки більш ніж з 60 ліній.

Важливо, що отримані результати засвідчили про експресію генів у T1-поколінні трансформантів. Слід відмітити, що відсоток рослин, стійких до селективного агенту з використанням Cre/loxP1 виявивсявищим в порівняні з Cre/loxP2, що вказує про більш ефективний варіант цієї векторної конструкції. Причому збереження значного рівня стійкості рослин до гіроміцину дає підставу говорити про стабільну генетичну трансформацію отриманих ліній арабідопсиса.

Важливе значення при селективному доборі має також визначення ефективної концентрації антибіотика, оскільки відомо, що гіроміцин здатен пригнічувати ріст, індукцію пагоноутворення та укорінення пагонів. Автором встановлено, що концентрація гіроміцина, яка складала 100 мг/л, була оптимальною для добору трансгенних варіантів.

Гістохімічний аналіз полоління трансформантів T1. Автором показано, що близько 25% трансгенних ліній є вільними від маркерних послідовностей. В той час як у 12% ліній забарвлення могло було як позитивним, так й відсутнім повністю. В 15% протестованих ліній відбулася автоексцизія.

Молекулярно-генетичний аналіз трансформантів T1-покоління.

Результати молекулярно-генетичного аналізу трансформантів T1-покоління з використанням блот-гібридизації по Саузерну підтвердили події генетичної трансформації та виявлення рекомбіназної ексцизії. За результатами аналізу T1-покоління було виявлено збільшення кількості трансгенних ліній з химерним забарвленням порівняно з TO-рослинами. Також зростала кількість ліній, в яких не спостерігалося забарвлення за GUS-тестом.

Молекулярно-генетичний та гістохімічний аналіз трансформантів

Тем не менш слід сказати, що за результатами гістохімічного аналізу T2-покоління встановлено збільшення кількості трансгенних ліній із химерним забарвленням, що, на думку автора, може бути пов'язаним із епігенетичним мовчанням трансгенів, яке може здійснюватися як на транскрипційному, так й на посттранскрипційному рівнях. Слід також

відмітити, що при дослідженні трансформантів арабідопсиса збільшувалося кількість ліній, вільних від маркерних та селективних ліній, що засвідчило про функціонування рекомбінази в наступних поколіннях трансгенних рослин.

Для підтвердження виявлення події генетичної трансформації проводили ПЛР-аналіз та blot гібридизація по Саузерну, результати досліджень обробляли статистично, використовуючи, зокрема однофакторний дисперсійний аналіз між двома вибірками трансформантів, а також регресійний аналіз прояву функціонування конструкцій ДНК у насіннєвому поколінні. Важливо, що автор використовувала й мультиваріативний метод.

У розділі «Узагальнення» стисло і чітко узагальнені результати експериментальної роботи, які підтверджують обґрунтованість робочої гіпотези автора.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Логічне та обґрунтоване планування досліджень дозволило дисертанту виконати поставлені завдання і одержати великий обсяг оригінального експериментального матеріалу, який вносить суттєвий вклад в розробку новітніх молекулярних біотехнологій, спрямованих на отримання трансгенних рослин, вільних від маркерних послідовностей.

Наукова новизна одержаних результатів. Розроблено дизайн та створено векторні 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 векторних 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 *Agrobacterium*-опосередкованої агробактеріальної трансформації *A. thaliana* способу методу занурення квіток із заличенням синтезованих векторних конструкцій.

Встановлено, що в результаті використання запропонованих ДНК-конструкцій із залученням рекомбіназної системи Cre/loxP 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, які входять до складу векторних 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 генетичної трансформації рослин, отриманих за допомогою створених ДНК-конструкцій із залученням сайт-специфічної системи Cre/loxP.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено новий підхід для одноетапного отримання трансгенних рослин за допомогою векторних конструкцій із сайт-специфічною системою Cre/loxP. Запропонований підхід є значним внеском у вирішення проблеми зниження потенційних ризиків від вивільнення ГМ рослин у навколишнє середовище. В результаті проведеної роботи з використанням сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP у розроблених ДНК-конструкціях доведено, що цей підхід значно спрощує процес генетичної трансформації і дозволяє рекомендувати його до використання в практичних цілях. Таким чином, результати досліджень можуть бути використані для отримання ГМ рослин як з науково-дослідною метою, так і з метою розроблення стратегії генетичної трансформації однодольних та дводольних рослин для практичного використання. Розроблена статистична класифікаційна модель дозволяє передбачити ефективність використання розроблених векторних ДНК-конструкцій на інших рослинних об'єктах, що також спрощує використання розробленого підходу.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Результати наукових досліджень опубліковано у 9 наукових публікаціях. Серед них є 7 статті у фахових наукових виданнях згідно переліку МОН України та 2 тез наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, 3 розділів, заключної частини, висновків, списку літератури, додатків. Матеріали дисертації викладені на 142 сторінках друкованого тексту, містять 21 рисунок, 7 таблиць та два додатки. Список використаних джерел складає 234 найменувань.

Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту та оформлення.

Високо оцінюючи теоретичне й практичне значення матеріалів даної дисертації, слід відмітити деякі недоліки та невдалі вирази, які не впливають на достовірність положень та висновків, сформульованих у дисертації:

В даній роботі мова йде про трансгенні, а не про трансформовані рослини;

Agrobacterium- опосередковану трансформацію, а не про агробактеріальну трансформацію; експресію трансгенів, а не Т-ДНК;

Невдало фраза множинного введення трансгенних конструкцій в геном (мова йде про інтеграцію генів в геном)

Підвищена стійкість трансформантів, а не їх резистентність; оптичну щільність, а не густину; розмір нуклеотидних послідовностей, а не довжину. Можна було повніше висвітлити інформацію стосовно використання сайт специфічних інших рекомбіназних систем в технології отримання вільних від маркерних послідовностей трансгенних рослин.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які висуваються до наукового ступеня доктора біологічних наук.

Вважаю, що за актуальністю, науковою значимістю та рівнем проведених досліджень дисертаційна робота Секан Альони Сергіївни

відповідає вимогам пункту 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника, затвердженого Постановою кабінету Міністрів України від 24.07.2013р. №567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – Біотехнологія.

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
в.о. завідувача відділу генетичної інженерії
Інституту фізіології рослин і
генетики НАН України

Тищенко О. М

