

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу РОКИЦЬКОГО Ігоря Володимировича
"Біоінформатичні підходи та репортерна система для дослідження особливостей
вживання кодонів у геномах стрептоміцетів", представлену до захисту на
здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю
03.00.22 – молекулярна генетика

З'ясування особливостей кодонного складу в геномах залишається важливою проблемою молекулярної генетики. Явище переважного використання деяких синонімічних кодонів у порівнянні з іншими є добре відомим, але залишаються нез'ясованими його причини і конкретні закономірності переважного використання кодонів у різних організмів – зокрема, у стрептоміцетів. Оскільки стрептоміцети широко використовуються в біотехнологіях, інформація про кодонний склад в їхніх геномах має важливе практичне значення. Дисертаційна робота І. В. Рокицького в основному присвячена дослідженню кодонного складу у стрептоміцетів і розробці нових інструментів для такого дослідження. Зважаючи на зазначене вище, тему дисертаційної роботи слід визнати **актуальною** – як у фундаментальному, так і у прикладному аспектах.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень кафедри генетики і біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 129 сторінок основного тексту і 3 додатки. Дисертація ілюстрована 39 рисунками і 6 таблицями, список використаних джерел містить 102 посилання. В цілому дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 9 публікацій, в тому числі 6 статей у фахових наукових виданнях. Серед них 4 статті надруковано в журналах, що входять до наукометричної бази даних Scopus та мають імпаکت-фактор на рівні 1,5–2. Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо моделей еволюції нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, особливостей вживання кодонів, загальної характеристики стрептоміцетів і ролі одного з рідкісних лейцинових кодонів є стислим, але змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано широкий набір сучасних методів молекулярної генетики, біоінформатики і мікробіології, описаних у Розділі 2: методи культивування штамів мікроорганізмів, генетичного аналізу, отримання рекомбінантних молекул ДНК, електрофорез, полімеразна ланцюгова реакція, методи трансформації бактеріальних клітин, широкий набір біоінформатичних методів, методи комп'ютерного програмування тощо.

Робота І. В. Рокицького мала на меті з'ясувати особливості кодонного складу у геномах стрептоміцетів (у тому числі, в еволюційному аспекті), розробити новий програмний інструмент для візуалізації кодонних заміщень і створити нову репортерну систему для вивчення особливостей трансляції рідкісного кодону UUA. Отримані результати представлено у розділі 3.

Перший підрозділ присвячено визначенню найбільш адекватних еволюційних моделей нуклеотидних і амінокислотних заміщень у стрептоміцетів. Автор переконливо продемонстрував, що для генів білків різних функціональних класів є адекватними різні моделі замін. Це зроблено на прикладі генів одного ферменту, одного мембранного білка і семи транскрипційних факторів. Хотілося б побажати автору продовжити дослідження в цьому напрямі з метою збільшити кількість проаналізованих генів і їхніх функціональних класів та з'ясувати причини такої різниці.

У підрозділі 3.2 проаналізовано особливості вживання пар кодонів (дикодонів) у геномах стрептоміцетів. Автору вдалося знайти кілька пар кодонів, які мають тенденцію або частіше зустрічатись разом, або уникати один одного. Ці результати є потенційно важливими для подальшого аналізу контекстного вживання кодонів у геномах.

Підрозділ 3.3 викликає особливий інтерес. У ньому представлено розроблений автором новий програмний веб-інструмент для візуалізації замін

кодонів, який може стати корисним для аналізу еволюції кодонного складу в різних геномах.

У підрозділі 3.4 проаналізовано кількості генів лейцинових тРНК і так званих близько-споріднених тРНК (антикодон яких відрізняється одним нуклеотидом, внаслідок чого можлива містрансляція) в геномах шести видів стрептоміцетів. Крім того, описано теоретичну модель, яка дозволяє оцінювати швидкість елонгації того чи іншого кодону за допомогою споріднених до нього і близько-споріднених тРНК. Модель застосовано для оцінки швидкості елонгації лейцинових кодонів близько-спорідненими тРНК.

В останньому підрозділі описано розроблену автором репортерну систему для вивчення впливу ефективності трансляції рідкісного для стрептоміцетів кодону UUA на метаболізм цих організмів. Система базується на використанні створеної конструкції, що містить ген β -галактозидази, де один з лейцинових кодонів замінено на TTA. Отримані результати свідчать про належне функціонування створеної системи як у дикому типі одного з видів стрептоміцетів, так і в мутанті з делецією гена спорідненої до кодона UUA тРНК. Отримано дані, які свідчать про можливість містрансляції цього рідкісного кодона.

У Розділі 4, який присвячено аналізу отриманих результатів, автор, обговорюючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, пропонує пояснення встановлених закономірностей та обговорює перспективи застосування розроблених у роботі біоінформатичного і експериментального інструментів.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи І. В. Рокицького полягає в тому, що в ній описано оптимальні моделі заміщень в генах, що відносяться до різних функціональних класів, проаналізовано кодонний склад в геномах стрептоміцетів, розроблено новий біоінформатичний інструмент для візуалізації та аналізу кодонних заміщень та створено нову репортерну систему для вивчення трансляції рідкісних кодонів. Представлені у роботі дані

збагачують знання щодо закономірностей вживання кодонів. Розроблений у роботі біоінформатичний інструмент може бути використаний при аналізі еволюційних процесів, а репортерна система – при дослідженнях механізмів контролю експресії генів. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування перш за все в наукових дослідженнях у галузях молекулярної біології і генетики, а також у біотехнологічних розробках, що проводяться в академічних та освітніх установах, які працюють над вивченням закономірностей біологічної еволюції, принципів організації геномів, механізмів регуляції білкового синтезу і пошуком нових підходів у використанні стрептоміцетів для продукції біологічно активних речовин.

Використання сучасних експериментальних методів, застосування теоретичних і експериментальних підходів, що доповнюють один одного, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і висновками інших авторів дозволяють констатувати загальну **достовірність теоретичних і експериментальних результатів та обґрунтованість наукових висновків.**

Проте, до дисертаційної роботи І. В. Рокицького виникли наступні **зауваження та запитання.**

1. Два запитання виникло до підрозділу 3.1, де аналізувались моделі нуклеотидних і амінокислотних заміщень. По-перше, автор стверджує, що "моделі, ґрунтовані на методі вирівнювання MAFFT у більшості випадків не узгоджуються з тими моделями, які впливають з трьох інших алгоритмів вирівнювання". Насправді ж, як видно з табл. 3.1, тільки для одного гена з трьох оптимальна модель заміщень при вирівнюванні за алгоритмом MAFFT не співпадає з моделями, що виявляються як найкращі для інших алгоритмів вирівнювання. По-друге, автор зазначає, що одно з дерев на рис. 3.1 побудовано для гена транскрипційного фактора AdpA "на основі оптимальної моделі GTR". Але ця модель зовсім не фігурує як оптимальна для генів транскрипційних факторів у табл. 3.1, 3.3.

2. У підрозділі 3.2 автор наводить дані про деякі контекстні закономірності вживання кодонів у *Streptomyces*: виявлено 9 пар кодонів, що

частіше знаходяться поряд, і 2, – в яких кодони мають тенденцію уникати один одного. Ці результати є цікавими, але наприкінці підрозділу автор робить спробу вивести консенсуси ("патерни") для послідовностей знайдених дикодонів. Для таких малих вибірок (від двох до чотирьох знайдених послідовностей) ці консенсуси виглядають дещо сумнівними.

3. Не зовсім вдалою є використана автором термінологія щодо різних (по відношенню до певного кодона) типів тРНК. Загально вживаними є терміни *споріднена* (cognate) тРНК (антикодон якої впізнає даний кодон), *неспоріднена* (non-cognate) тРНК (антикодон якої не впізнає даний кодон) і *близько-споріднена* (near-cognate) тРНК (яка акцептує неспоріднену амінокислоту і антикодон якої, відрізняючись від антикодону спорідненої тРНК одним нуклеотидом, здатен з певною імовірністю впізнавати даний кодон). Споріднені тРНК автор чомусь називає "акцепторними". Такий термін (як і "неакцепторні" тРНК) взагалі не використовується – це слово має відношення до акцептування амінокислоти (як, скажімо, ізоакцепторні тРНК, що акцептують одну й ту саму амінокислоту), а не до кодон-антикодонової взаємодії.

4. У першому стовпчику табл. 3.3, на мою думку, було б доцільніше записати лейцинові кодони, а не антикодони. Більш суттєве зауваження стосується рис. 3.11, 3.13 і 3.14: представлені на них кореляції між кількостями копій генів споріднених і близько-споріднених тРНК виглядають сумнівними. Цікаво було б знати, які коефіцієнти кореляції відповідають зображеним залежностям.

5. У підрозділі 3.4 описано модель, яка дозволяє оцінювати швидкість трансляції. Модель виглядає занадто спрощеною у кількох аспектах. По-перше, модель для оцінки *швидкості* повинна була б базуватись на кінетичних рівняннях. По-друге, швидкість трансляції кодону очевидно залежить від концентрації усіх типів тРНК: неспоріднені тРНК також на деякий час зв'язуються з рибосомою, конкуруючи зі спорідненими. Так само, близько-споріднені тРНК конкурують зі спорідненими, як і навпаки – швидкість трансляції кодону близько-спорідненими тРНК (рівн. 3.2) має залежати також

від концентрацій і ймовірностей приєднання усіх інших tРНК. Отже, висновок, сформульований на основі такої спрощеної моделі (про те, що рідкісний кодон може транслюватись не менш точно, ніж популярні кодони) виглядає занадто категоричним. У всякому разі, власні експериментальні дані автора про можливість містрансляції кодона UUA (підрозділ 3.5) дещо суперечать такому висновку.

6. При обговоренні результатів автор стверджує, що "високий GC-склад геномної ДНК стрептоміцетів – це наслідок кодоних заміщень під дією еволюційних сил, а точніше певний рушійний добір на кодонному рівні". З цим важко погодитись. По-перше, що вказує на добір і чому він рушійний, у якому напрямку? Яку еволюційну перевагу можуть надавати GC-збагачені кодони? По-друге, пояснення високого GC-складу як причини більш високої частоти GC-збагачених кодонів є простішим, а отже більш очевидним – поки не доведено протилежне. Автор наводить тільки один аргумент на користь своєї ідеї: про те, що процеси мутагенезу у бактерій спрямовані у бік підвищення АТ-вмісту, а отже, оскільки стрептоміцети є відносно молодим таксоном, вони повинні були б мати не вищий, а може й нижчий, GC-вміст порівняно з древнішими таксонами. В цьому є сенс, але може бути багато різних причин для високого GC-вмісту у стрептоміцетів: наприклад, з метою підвищення стабільності подвійної спіралі ДНК. Тоді переважне використання GC-збагачених кодонів є автоматичним наслідком підвищеного вмісту GC-пар.

7. У тексті дисертації зустрічаються поодинокі друкарські, стилістичні і пунктуаційні помилки.

Наведені зауваження жодним чином не впливають на загальну *високу* оцінку розглянутої роботи.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Рокицького Ігоря Володимировича "Біоінформатичні підходи та репортерна система для дослідження особливостей вживання кодонів у геномах стрептоміцетів" є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю

актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертація повністю відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри загальної та медичної генетики
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського
національного університету імені Тараса Шевченка

А. В. Сиволоб

Підпис проф. А. В. Сиволоба засвідчую

Заст. директора ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського
національного університету імені Тараса Шевченка

