

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Ющука Олександра Сергійовича** «Генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків», представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Дисертаційна робота О. С. Ющука «Генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків» присвячена надзвичайно актуальній темі вивченню механізмів біосинтезу антибіотиків. Обрана тема без сумніву є найважливішою з огляду на те, що за останні десятиріччя виникли штами мікроорганізмів стійкі до більшості відомих антибіотичних препаратів, тому існує потреба у відкритті нових антибіотичних сполук та створенні надпродуцентів цих сполук. Вивчення генетичних факторів, що впливають на біосинтез антибіотиків дає змогу розробляти ефективні підходи до їх надпродукції.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційну роботу О.С. Ющук виконував в науково-дослідній лабораторії генетики, селекції та генетичної інженерії продуцентів біологічно активних речовин (НДЛ-42) кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка, в межах чотирьох держбюджетних тем: БГ-41Нр «Універсальний генетичний механізм контролю продукції біологічноактивних речовин стрептоміцетами» (№ держреєстрації 0116U008070), БГ-46Ф «Нові гени актинобактерій, що контролюють продукцію і стійкість до антибіотиків-інгібіторів синтезу пептидоглікану» (№ держреєстрації 0117U001224), БГ-09Ф «Мутації стійкості актинобактерій до антибіотиків: джерело нових уявлень про механізми резистентності та біотехнологічних знарядь» (№ держреєстрації 0120U102039); теми Державного Фонду фундаментальних досліджень України у рамках співпраці з Японським товариством сприяння науки (JSPS) Ф80-2018 «Посттранскрипційні модифікації тРНК як регулятори первинного й вторинного метаболізму в актинобактерій»; у рамках спільної грантової програми МОН України й Федерального Міністерства освіти і науки Німеччини (BMBWF) М/18- 2017 і М/26-2018 «Плейотропні транскрипційні регулятори родини AdpA як знаряддя відкриття нових природних біоактивних сполук», за індивідуальними комерційними грантами та персональним грантом (2018-2020, 2022 р.) від Університету Інзубрії, Італія.

### **Основні результати, отримані дисертантом, їх наукова новизна та практичне значення.**

У дисертаційній роботі О. С. Ющукотримано пріоритетні за науковою новизною результати, зокрема вперше:

- Вивчено поширеність групи AdpA-регуляторів в геномах стрептоміцетів, показана дводоменна архітектура AdpA, виявлено, що

експресія окремо ДНК-зв'язувального домена AdpA здатна комплементувати відсутність повного білка AdpA (дводоменного).

- Вперше описані гени *miaA* і *miaB* як компоненти AdpA-опосередкованого регуляторного каскаду.

- Показано, що можна використовувати спори штамів *A. rectilineatus* NRRL B-16090, *S. roseochromogenes* NRRL 3504, *N. coxensis* DSM 45129 – як реципієнти для переносу плазмід, які створені на основі систем інтеграції фагів  $\phi$ C31,  $\phi$ BT1, VWB1, і pSG5- реплікона, із залученням кон'югації з *E. coli*.

- Визначено, що гетерологічні промотори *aac(3)IVp*, *moeE5p* і *tei2p* є ефективними інструментами для надекспресії генів в NRRL B-16090.

- Доведено, що вектор pGСумRP21 є ефективною платформою для експресії генів в NRRL 3504: зокрема для надекспресії генів шлях-специфічних регуляторів біосинтезу хлоробіоцину і новобіоцину, що приводить до збільшення рівня продукції хлоробіоцину в 30 разів порівняно із диким типом.

- Визначено, що у *N. gerenzanensis* ATCC 39727 найактивнішим конститутивним промотором, підходящим для надекспресії генів, є *aac(3)IVp*. Надекспресія генів шлях-специфічних регуляторів біосинтезу A40926 *dbv3* і *dbv4* за допомогою *aac(3)IVp* веде до зростання продукції A40926 рекомбінантними штамми у 2-3 рази. Це є важливим для промислового отримання цього клінічно-значущого антибіотика.

- Вперше створено повну збірку генома штаму *N. coxensis* DSM 45129, який здатний продукувати новий (досі не описаний) глікопептидний антибіотик – названий A50926; відповідно, вперше анотовано і охарактеризовано кластер генів біосинтезу A50926 – названий *noc*. Показано, що гетерологічні регулятори *dbv3* і *dbv4* збільшують рівень продукції A50926 у декілька разів, а експресія гена гексозооксидази *dbv29* веде до продукції A40926 в DSM 45129.

- Визначено за допомогою біоінформаційного аналізу понад двох тисяч геномів стрептоміцетів, що кластери біосинтетичних генів, подібні до кластера генів біосинтезу глікопептидного антибіотика типу V комплестатину, поширені в стрептоміцетів і можуть кодувати біосинтез норкомплестатину, N-малоніл-норкомплестатину і N-ацетил-норкомплестатину, як впливає із результатів моделювання біосинтетичних шляхів *in silico* за гомологією із відомими шляхами біосинтезу.

- Вперше секвеновано геном *S. cyanogenus* S136 – продуцента ландоміцину А. Визначено, що *adpA* алель S136 нефункціональний, тоді як експресія гетерологічних алелів *adpA* веде до багатократного (приблизно 10 разів) зростання продукції ландоміцину А в S136. Також, експресія гетерологічних алелів *adpA* веде до активації біосинтезу полієнового полікетиду люцензоміцину.

- Описано й охарактеризовано кластер біосинтетичних генів люцензоміцину – названий *lcm*. Показано, що активація *lcm* опосередкована активністю генів шлях-специфічних регуляторів *lcmRII* і *lcmRIII*.

- Автором детально вивчено і описано механізми стійкості до тейкопланіну в продуцента *A. teichomyceticus* ATCC 31121.
- Вивчено поширення генів стійкості до ГПА – *van*-генів серед актинобактерій, Грам-позитивних бактерій *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia* і *Ktedonobacteria*, а також до Грам-негативних бактерій – класу *Anaerolineae*.
- Показано, що присутність *van*-генів не корелює з присутністю КБГ ГПА, а самі ці гени є преадаптацією для отримання КБГ шляхом горизонтального генного переносу.

Дисертаційна робота О. С. Ющука виконана на найвищому методичному рівні, отримані результати відповідають меті і завданням роботи, мають практичне та теоретичне значення.

О. С. Ющуком ідентифіковано регулятори, які можуть бути мішенями для подальших досліджень та можуть бути використані для створення інших штамів-надпродуцентів антибіотиків.

### **Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій сформульованих у дисертації.**

Зроблені дисертантом у роботі висновки є науково обґрунтованими. Результати досліджень опубліковані у наукових виданнях, що належать до бази даних Scopus, WoS, у фахових виданнях України та були широко представлені на міжнародних наукових конференціях.

Сформульовані положення та висновки дисертаційного дослідження ґрунтуються на низці взаємопов'язаних результатів біоінформаційних та експериментальних досліджень. Здобувачем проаналізовано значну кількість літературних джерел, пов'язаних з темою дисертації, серед яких переважають іноземні публікації у рейтингових журналах. Основні положення дисертації, її висновки та рекомендації базуються на достатньому обсязі отриманого експериментального матеріалу і є обґрунтованими та достовірними.

Основні положення і результати проведених досліджень сформульовані у 9 висновках, що логічно складаються з отриманих здобувачем експериментальних даних

### **Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях.**

Результати досліджень, представлені в дисертаційній роботі, повністю викладені в опублікованих роботах. За результатами роботи опубліковано 44 наукові роботи, з яких 3 статті в українських фахових виданнях та 20 статей у зарубіжних наукових фахових виданнях, зокрема, 11 – у виданнях Q1, 6 – у виданнях Q2, 3 – у виданнях Q3, 1 розділ в монографії; 1 патент України на винахід та 19 тез доповідей у збірниках матеріалів міжнародних і вітчизняних наукових конференцій.

### **Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації.**

Представлена до захисту дисертаційна робота є оригінальним науковим дослідженням, що, як зазначалося вище, суттєво розширюють наші уявлення

про генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків.

Дисертація складається із таких частин:

- **Вступу**, де автор детально аналізує проблематику дослідження, висвітлює актуальність і обґрунтовує мету та завдання дослідження.
- **Розділу 1 «Огляд літератури»**, представленому оглядовими публікаціями автора, в яких детально описаний сучасний стан вивчення полікетидних і глікопептидних антибіотиків.
- **Розділу 2 «Матеріали і методи дослідження»**, в якому автор перелічує основні штами бактерій, використаних у роботі, а також дає коротку характеристику методів досліджень, використаних у роботі.
- **Розділу 3 «Плейотропні регулятори морфогенезу і вторинного метаболізму стрептоміцетів, що належать до *adpA*-опосередкованого каскаду і *YtrA* підродини, як знаряддя для контролю продукції антибіотиків»**, що складається із публікацій автора, присвячених вивченню еволюції глобальних регуляторів *AdpA*, інших компонентів *AdpA*-опосередкованого регуляторного каскаду стрептоміцетів, а також плейотропних регуляторів *YtrA*-підродини.
- **Розділу 4 «Підходи до генно-інженерних маніпуляцій із *Actinoplanes rectilineatus* NRRL B-16090 і *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504»**, що складається із публікацій автора, присвячених створенню знарядь для генно-інженерних маніпуляцій із цими штамми, потенційними продуцентами пептидних антибіотиків.
- **Розділу 5 «Гени, що контролюють продукцію глікопептидних антибіотиків в бактерій роду *Nonomuraea*»**, що складається із публікацій автора, присвячених вивченню продукції глікопептидних антибіотиків A40926 і A50926 в штаммах роду *Nonomuraea*.
- **Розділу 6 «Особливості порівняльної філогеноміки кластерів генів біосинтезу глікопептидних антибіотиків»**, представленому публікаціями автора, в яких робиться філогеномний аналіз кластерів генів біосинтезу глікопептидів, з акцентом на кластери генів біосинтезу сполук, подібних до комплестатину.
- **Розділу 7 «Регуляція продукції антибіотиків в *Streptomyces cyanogenus* S136 – моделі активації мовчазних кластерів біосинтетичних генів»**, представленому публікаціями автора, в яких описано вплив алелів гена *apdA* на вторинний метаболізм продуцента полікетидних антибіотиків *S. cyanogenus*.
- **Розділу 8 «Гени стійкості до глікопептидних антибіотиків в бактерій»**, представленому публікаціями автора, в яких висвітлюються аспекти функціонування і еволюції генів стійкості до глікопептидних антибіотиків у бактерій.
- **Висновків.**
- **Списку використаних джерел.**
- **Додатку**, в якому наведено список публікацій здобувача.

Але є окремі зауваження до оформлення роботи і питання, що потребують роз'яснення:

- На стор. 79 є незрозумілий вислів – «...з актинопланет і неідентифікованих ізолятів/метагеномних зразків...», який варто прокоментувати;
- Простежується зсув назв Розділів 3, 4, 5, 6,7, 8 у лівий бік на стор. 135, 162, 192, 232, 249, відповідно. Відсутня крапка після номеру розділу;
- Стор. 103. невдалий вираз – «володіє ідентичністю амінокислотної послідовності ...на рівні 60%...» краще – має ідентичність...чи демонструє ідентичність;
- Стор. 105. Незрозуміле речення – «Порівнявши  $\beta$ -глюкуронідазну активність отриманих рекомбінантних штамів, ми виявили, що вона порівнянна у SAM2 pSAGA<sup>+</sup>, SAM2 pSAGAt<sup>+</sup> і  $\Delta miaA$  pSAGAt<sup>+</sup>, але практично відсутня в  $\Delta miaA$  pSAGAt<sup>+</sup>».
- Стор. 148. Незрозуміле, чому обране позначення UXX, а не UXX – «...через порушення декодування кодонів UXX і зокрема UUA».
- Стор. 199. Відсутня «,» перед «які»;
- Стор. 201. Бажано взяти у коми вираз – «...як про продуцентів ГПА...».
- Стор. 269. Не узгоджено число «...гени, який...».
- Стор. 275. Невдалий вираз – «Ландоміцин А.... один з **найбільших** глікозильованих ... антибіотиків».
- Було би корисним, якщо б автор надав пояснення – у чому виражається вироджена операторна послідовність транскрипційного фактору AdpA;
- Було би корисним, якщо б автор надав пояснення до речення на стор. 307 – «...оскільки конститутивна експресія *van*-генів веде до зниження загального фітнесу клітин»;
- Стор. 381. Незрозуміле речення – «Однак, на даний момент лише Tba з КБГ баліміцину в *Am. balhimycina* DSM 5908 [176]»;
- Було би цікаво отримати від автора більш конкретне визначення мобілому, про який вказано на стор. 399, що «*van*-гени з бактерій типу *Actinobacteria* є цікавою та розповсюдженою частиною мобілому *Terrabacteria*».

В цілому робота вражає своєю ємністю, насиченістю, спрямованістю на вирішення питань з отримання надпродуцентів пептидних і полікетидних антибіотиків. В роботі дуже сильною є як складова з молекулярної генетики, так і з біоінформатики.

**Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до докторських дисертацій.**

Дисертаційна робота **Ющука Олександра Сергійовича** «Генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків», є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним

рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, глибиною розкриття поставлених проблем, логічністю і обґрунтованістю висновків дисертація повністю відповідає вимогам «Порядку присудження і позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 року №1197, а її автор **Ющук Олександр Сергійович** заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Завідувач кафедри  
молекулярної біології, біохімії та генетики  
Одеського національного університету  
імені І.І. Мечникова,  
член-кор. НААН, проф., с.н.с., д.б.н.



С.В. Чеботар

Підпис професора С.В. Чеботар засвідчую.

Проректор з науково-педагогічної роботи  
Одеського національного університету  
імені І.І. Мечникова,  
доцент, к.б.н.



О.В. Запорожченко

5.09.2023