

ВІДГУК

офіційного опонента Волкова Романа Анатолійовича

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.

Актуальність роботи. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я, бактерійні інфекції, спричинені стійкими до антибіотиків патогенами, будуть одними із лідируючих причин смертності в наступні десятиліття. Такий прогноз особливо загострюється в теперішній «постковідний» період, бо впродовж пандемії нераціональне використання антибіотиків досягло свого піку, а наслідки цього лише належить оцінити. Відповідно, проблема пошуку нових природних антибіотиків набуває ще більшої актуальності. Хоча перший антибіотик – пеніцилін – було виділено з представників роду *Penicillium* (що належать до еукаріотичних аскомікотових грибів), на сьогодні більшість клінічних антибіотиків є продуктами бактерій, зокрема актиноміцетів. Саме тому дослідження актиноміцетів як продуцентів антибіотиків дозволяє отримати нові інструменти для подолання проблеми антибіотикорезистентності. Цій проблематиці присвячено дисертаційну роботу Ющука О.С., у якій за допомогою сучасних методів практичної мікробіології, молекулярної генетики, аналітичної хімії, біоінформатики і порівняльної геноміки розроблено нові підходи до відкриття антибіотиків із актиноміцетів. Отже, тематика дослідження є актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота Ющука О.С. виконувалася 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. Роботу виконано в межах держбюджетних тем БГ-41Нр «Універсальний генетичний механізм контролю продукції біологічно-активних 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»; тем у рамках спільної грантової програми Міністерства освіти і науки України й Федерального Міністерства Німеччини освіти і науки Німеччини (BMBF) M/18-2017 «Плейотропні транскрипційні регулятори родини AdpA як знаряддя відкриття нових природних біоактивних сполук», M/26-2018 «Плейотропні транскрипційні регулятори родини AdpA як знаряддя відкриття нових природних біоактивних сполук». Частина досліджень виконано під час наукового стажування на факультеті біотехнології та наук про життя Університету Інзубрії (Італія, 2018-2020, 2022 р.) за індивідуальними комерційними грантами та персональним грантом від Університету Інзубрії. За роботи, представлені в цій дисертації, автор отримав Премію Верховної Ради України молодим ученим за 2021 рік (постанова ВРУ № 2833-IX від 13 грудня 2022 року).

Наукова новизна результатів, отриманих в дисертаційній роботі. Під час виконання дисертаційного дослідження Ющук О.С. отримав низку результатів, які суттєво доповнюють і розвивають сучасні уявлення про молекулярні механізми регуляції біосинтезу пептидних і полікетидних антибіотиків, що синтезуються актиноміцетами.

Зокрема, Ющук О.С. вивчив еволюцію AdpA-подібних регуляторів і показав, що вирішальну регуляторну роль у цих білках відіграє ДНК-зв'язувальний домен; продемонстрував роль інших компонентів пов'язаного з *adpA* каскаду регуляторів в *Streptomyces albus* J1074; дослідив функції YtrA-подібних регуляторів на моделі *S. coelicolor* A3(2). Автором розроблено ефективні методи для генно-інженерних маніпуляцій і платформи експресії генів в продуцентах пептидних антибіотиків *S. roseochromogenes* NRRL 3504, *Actinoplanes rectilineatus* NRRL B-16090, *Nonomuraea gerenzanensis* ATCC 55076, *N. coxensis* DSM 45129. За допомогою методів порівняльної геноміки і прикладної генетики Ющук О.С. відкрив і описав біосинтетичний шлях нового ГПА (який був названий A50926) в *N. coxensis* DSM 45129. Автором продемонстрована роль гетерологічних алелів *adpA* в продукції полікетидного антибіотика ландоміцину А в *S. cyanogenus* S136, а також можливість застосування цих алелів в якості знарядь активації мовчазного вторинного метаболізму, що дозволило вперше описати КБГ полікетидного антибіотика люцензоміцину. На основі результатів досліджень автора було побудовано повноцінну модель функціонування генів

стійкості до тейкопланіну в *A. teichomyceticus* ATCC 31121 і охарактеризовано особливості розповсюдження і еволюції генів стійкості до глікопептидів серед бактерій.

Практичне значення отриманих результатів. Ющук О.С. отримав в своїй роботі ряд важливих практичних результатів. Зокрема, автором створено надпродуцентів хлоробіоцину, клінічно-важливого глікопептиду A40926, глікопептиду A50926, полікетидів ландоміцину А і люцензоміцину. За допомогою підходів комбінаторного біосинтезу шляхом гетерологічної експресії гена *dbv29* створено альтернативного продуцента A40926 на основі *N. coxensis* DSM 45129. Вагомим є те, що Ющук О.С. продемонстрував важливість алелів глобального регуляторного гена *adrA* як знарядь для активації мовчазних КБГ, зокрема КБГ люцензоміцину в *S. cyanogenus* S136. На ці результати було отримано Патент України на винахід. Не менше важливим практичним результатом роботи є каталогізація і опис розповсюдження (та механізмів поширення) генів стійкості до ГПА серед усіх бактерій, що має значення для нагляду за виникненням множинно-резистентних штамів.

Особистий внесок здобувача. Автор здійснив аналіз і пошук літературних джерел за темою дисертації, сформулював мету, задачі і висновки дослідження. Автор брав безпосередню участь у дослідженні глобальних регуляторних генів *S. albus*, вивчав роль гетерологічних алелів *adrA* у впливі на вторинний метаболізм *S. cyanogenus*, активував і описав шлях біосинтезу люцензоміцину, відкрив продукцію нового глікопептидного антибіотика в *N. coxensis*, напрацював методологію генно-інженерних маніпуляцій в актиноміцетів, тощо. Автором власноруч проведено весь обсяг біоінформатичних досліджень, представлених в роботі. Більшість рукописів для публікацій, зібраних в дисертаційній роботі, були написані Ющуком О.С. власноруч, або за його активної участі.

Апробація результатів роботи. Основні результати дисертації доповідалися та обговорювалися на Міжнародній конференції «Integrative Biology & Medicine», Київ (2017); XII Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», Харків (2017); Міжнародній конференції «Advances in Microbiology and Biotechnology», Львів (2018); XIV Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», присвяченій 185 річниці від дня народження Б. Дибовського, Львів (2018); XIII Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», Харків (2018); XV Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», присвяченій 135 річниці від дня народження Я. Парнаса, Львів (2019); 3rd International

Conference on Natural Products Discovery and Development in the Genomic Era, San Diego (2020); XVII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», Львів (2021); Міжнародному онлайн конгресі «VAAM Workshop 2021», Тьобінген (2021); Міжнародному онлайн конгресі «ExpoBAC Zaragoza 2020», Сарагоса (2021); IV Міжнародній науковій конференції «Microbiology and immunology – the development», Київ (2022); XVIII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології» присвяченій 195 річниці від дня народження Ю. Планера, Львів (2022); на звітних наукових конференціях ЛНУ імені Івана Франка (2018-2022); звітних наукових конференціях факультету біотехнології та наук про життя Університету Інзубрії (2018-2020).

Ступінь обґрунтованості і достовірності наукових досліджень та висновків дисертаційної роботи. Робота Ющука О.С. є завершеним науковим дослідженням, виконаним на високому науковому і методологічному рівні. Сформульовані автором наукові положення і висновки підтверджено значним масивом даних, отриманих в ході експериментальних і біоінформатичних досліджень. Ющук О.С. використав сучасні методи біологічних досліджень, а саме: вивчення мікроорганізмів методами світлової та сканувальної електронної мікроскопії (SEM); культивування штамів актиноміцетів-продуцентів антибіотиків в умовах, наближених до промислових в лабораторних ферментерах; отримання і вивчення рекомбінантних штамів бактерій; виділення плазмідної та хромосомної ДНК, виділення сумарної РНК та синтез кДНК, рестрикційний аналіз плазмідної ДНК, конструювання рекомбінантних молекул ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), сиквенування ДНК, напівкількісна полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією; кількісний та якісний аналіз антибіотиків продукції антибіотиків за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ), високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та ВЕРХ із мас-спектрометрією (ВЕРХ-МС) чи тандемною мас-спектрометрією (МС/МС), екстракція антибіотиків, якісний і кількісний аналіз β -глюкуронідазної активності; аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, аотація генів, пошук та характеристика КБГ, моделювання біосинтетичних шляхів *in silico*, філогенетичний аналіз амінокислотних та нуклеотидних послідовностей.

Повнота викладу результатів роботи у наукових публікаціях. Отримані результати викладено у 44 наукових публікаціях, зокрема: в 3 публікаціях у наукових фахових виданнях України, 20 у зарубіжних наукових журналах, проіндексованих в міжнародних

наукометричних базах даних Scopus і Web of Science, 19 тезах доповідей на вітчизняних та закордонних наукових конференціях. Серед цих робіт: 7 експериментальних статей у журналах, що належать до Q1 SCImago; 6 експериментальних статей у журналах, що належать до Q2 SCImago; 3 експериментальні статті у журналах, що належать до Q3 SCImago; 4 літературні огляди у журналах, що належать до Q1 SCImago; 3 експериментальні статті у фахових виданнях України; один розділ монографії видавництва Springer і один патент України на винахід.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота є кваліфікаційною науковою працею на правах наукової доповіді за сукупністю статей, викладена на 460 друкованих сторінках. До складу роботи входять вступ, огляд літератури, розділ матеріалів та методів досліджень, а також 5 розділів аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновки, перелік використаних джерел і додаток. Розділами дисертації є публікації здобувача. Список використаної літератури включає 1549 позицій, з яких 1342 є в публікаціях здобувача. Робота містить 127 рисунків і 29 таблиць (в публікаціях здобувача).

Зміст дисертаційної роботи. Докторська дисертація Ющука О.С. є новаторською, і представлена у вигляді сукупності статей, опублікованих в журналах високого рівня.

У **вступі** дисертаційної роботи обґрунтовано актуальність дослідження продуцентів пептидних і полікетидних антибіотиків, як джерела нових сполук для боротьби із резистентними бактеріями. Коректно сформульовано мету, завдання, об'єкт і предмет дослідження, описано наукову новизну отриманих результатів, а також їх практичне значення.

Перший розділ роботи представлено розділом монографії і літературними оглядами в міжнародних журналах, вивчається проблематика роботи і сучасний стан проблеми. Зокрема, повно характеризуються сучасні знання і уявлення про біосинтез пептидних і полікетидних антибіотиків, регуляторні механізми біосинтезу цих сполук. Підсумовуються перспективні напрямки дослідження в біології пептидних і полікетидних антибіотиків.

У **другому розділі** роботи подано матеріали і методи досліджень – перераховано штами бактерій і основні плазміди, які використовувалися в роботі і наведено перелік і деталі основних методів досліджень.

У **третьому розділі** роботи охарактеризовано плеiotропні регулятори морфогенезу і вторинного метаболізму стрептоміцетів, що належать до *adpA*-опосередкованого каскаду і *YtrA*-підродина як знаряддя для контролю продукції антибіотиків. Автором здійснено пошук

ортологів AdpA у стрептоміцетів, геноми яких були доступні в базі даних GenBank на момент виконання роботи (2017 рік), і знайдено 390 послідовностей. Вивчено закономірності розміщення регуляторного TTA кодону у відповідних генах. Експериментально показано, що ДНК-зв'язувальний домен AdpA може виконувати у стрептоміцетів свою регуляторну роль за відсутності димеризаційного інтерфейсу. Вивчено інші компоненти *adpA*-опосередкованого регуляторного каскаду на моделі *S. albus* J1074: ген лейцинової тРНК *bldA*, гени A37-N6-диметилалілтрансферази *MiaA* і N6-ізопентеніл-A37-C2-метилтіотрансферази *MiaB*, що виявилися важливим для продукції антибіотиків у цього штаму. Досліджено особливості розповсюдження та філогенії YtrA-регуляторів в актинобактерій, а також їх властивості у модельного стрептоміцета *S. coelicolor* M145. Виявилось, що в *S. coelicolor* M145 ці гени мають маргінальну роль в морфогенезі і продукції антибіотиків.

В **четвертому розділі** описано підходи до генно-інженерних маніпуляцій із *Actinoplanes rectilineatus* NRRL B-16090 і *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504. Автором обрані ці мікроорганізми, як потенційні продуценти пептидних антибіотиків. Дотепер, обидва штами вважалися складними для генно-інженерних маніпуляцій, але автору вдалося розробити методи перенесення плазмід у ці штами, використовуючи як клітини-акцептори спори цих бактерій. Також, автор розробив набори векторів для експресії генів в цих штаммах і обрав оптимальні промотори. Зокрема, як репортерний ген в *A. rectilineatus* використано ген глюкуронідази, а в *S. roseochromogenes* – гени шлях-специфічних регуляторів продукції хлоробіоцину. Отримані результати торують шлях для подальшого вивчення нових пептидних антибіотиків у цих штаммах.

В **п'ятому розділі** дисертаційної роботи представлено результати вивчення генів, що контролюють продукцію глікопептидних антибіотиків в бактерій роду *Nonomuraea*. В цьому розділі роботи автор сфокусувався на дослідженнях, спрямованих у двох напрямках. По-перше, автор досліджував нові підходи до створення надпродуцентів клінічно-важливого глікопептиду A40926 (попередника антибіотика далбаванцину) в *N. gerenzanensis* ATCC 39727. Проаналізовано низку нативних і гетерологічних промоторів, в результаті чого обрано промотор гена стійкості до апраміцину для надекспресії шлях-специфічних регуляторів біосинтезу A40926 – *dbv3* і *dbv4*. Властивості штамів із надекспресією цих генів вивчалися як за лабораторних, так і наближених до промислових умов культивування, та було виявлено, що ці штами здатні до надпродукції антибіотика. По-друге, за допомогою порівняльної геноміки і сиквенування геному автор виявив новий кластер генів біосинтезу (названий *noc*) антибіотика, схожого на A40926, в *N. coxensis* DSM 45129. Структуру цього антибіотика було передбачено

in silico. Далі штам було вивчено експериментально, підібрано умови продукції глікопептиду, виділено антибіотик і вивчено його структуру. Отримані результати підтвердили передбачення *in silico*, а новий антибіотик отримав назву A50926.

В **шостому розділі** роботи представлено особливості порівняльної філогеноміки кластерів генів біосинтезу глікопептидних антибіотиків. Зокрема, автор продемонстрував закономірності еволюції цих кластерів. Порівняльна геноміка стрептоміцетів дозволила виявити ряд потенційних кластерів біосинтетичних генів, які ймовірно кодують біосинтез мало вивченої групи глікопептидів, подібних до комплестатину. Серед цих кластерів є цікаві кандидати для подальшого експериментального вивчення із метою відкриття нових глікопептидів.

У **сьомому розділі** роботи представлено результати вивчення механізмів регуляції продукції антибіотиків в *Streptomyces cyanogenus* S136. Секвенування генома відомого продуцента ландоміцину А – *S. cyanogenus* – дало змогу охарактеризувати геномний потенціал цього штаму до продукції антибіотиків, зокрема полікетидних. В подальших експериментальних дослідженнях автор виявив, що нативний алель гена *adpA* в *S. cyanogenus* є, найімовірніше, неактивним. Натомість, введення гетерологічних алелів гена *adpA* привело до значного збільшення продукції ландоміцину А. Більше того, автором виявлено вплив і на інші компоненти вторинного метаболізму *S. cyanogenus*, а саме - на продукцію пігментів і інших антибіотиків. Зокрема, введення гетерологічних алелів *adpA* стимулювало появу нової активності проти еукаріотичних грибів. Подальше вивчення продемонструвало, що ця активність є результатом продукції полікетидного антибіотика люцензоміцину, а секвенування генома дало змогу охарактеризувати кластер біосинтетичних генів цього антибіотика (названий *lcm*). Також виявилось, що біосинтез люцензоміцину опосередковується функціонуванням двох шлях-специфічних регуляторів.

У **восьмому розділі** роботи охарактеризовано гени стійкості до глікопептидних антибіотиків у бактерій. За допомогою серії експериментів *in vivo* і *in silico*, автор спочатку дослідив особливості функціонування генів стійкості до глікопептидів (або *van* генів) в продуцента тейкопланіну *A. teichomyceticus*. Виявилось, що низка факторів, а саме - сильні конститутивні промотори *van* генів і конститутивна кіназна активність сенсорної гістидинової кінази Tei3, є основою конститутивного фенотипу стійкості продуцента тейкопланіну до глікопептидів. Цікаво, що сенсорний домен Tei3 не здатний реагувати на тейкопланін, але на A40926, що, в сукупності з дослідженням еволюції глікозилтрансфераз біосинтезу глікопептидів, дозволило автору описати цікавий кейс ко-еволюції генів стійкості і кластерів

генів біосинтезу глікопептидів. Далі у цьому розділі автор дослідив розповсюдження *van* генів серед актинобактерій, і, в загальному, в бактерій. Результати порівняльного філогеномного аналізу дозволили автору зробити висновок, що саме актинобактерії є джерелом *van* генів, передача яких активно відбувається до інших груп бактерій за допомогою процесів горизонтального переносу генів.

Висновки роботи повністю відповідають поставленим в роботі завданням і ґрунтуються на отриманих результатах.

В **авторефераті** дисертаційної роботи викладено основний зміст розділів і висновки роботи Юшука О.С. Зміст автореферату і основних положень роботи є ідентичним.

Зауваження і запитання. В ході ознайомлення з дисертацією виник ряд запитань, які потребують уточнення дисертантом.

1. Автор характеризує *A. rectilineatus* і *S. roseochromogenes*, як потенційних продуцентів пептидних антибіотиків. Відповідно, хотілося би бачити більш детальну характеристику відповідних біосинтетичних шляхів.
2. За результатами роботи, надекспресія шлях-специфічного регуляторного гена *dbv3* веде до надпродукції А40926 за умов культивування в колбах Ерленмеєра, але не у ферментері, де штам поводить себе аберантно. Чи є експериментальні дані, які могли би пояснити цей феномен?
3. Хоча А50926 і дуже подібний на А40926, рівень продукції цього антибіотика в *N. coxensis* дикого типу на порядок нижчий, ніж рівень продукції А40926 в *N. gerenzanensis*. Які можуть бути причини таких відмінностей?
4. Автором отримано докази того, що нативний алель гена *adpA* *S. cyanogenus* є нефункціональним. Чи є у автора припущення щодо природи причин такої нефункціональності?
5. Показано вплив гетерологічних алелів гена *adpA* на вторинний метаболізм *S. cyanogenus*. Однак, з літератури відомо, що регуляторний ген *adpA* також контролює і морфологічну диференціацію стрептоміцетів. Чи досліджували вплив введення гетерологічних алелів гена *adpA* на морфологічну диференціацію *S. cyanogenus*?

Ці запитання жодним чином не впливають на високу позитивну оцінку представленої роботи.

Висновок. На основі викладеного вище аналізу, вважаю, що дисертаційна робота «Генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків», в якій розділами є публікації здобувача (у кількості не менше 10 у виданнях, віднесених до першого і другого кuartилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports), є завершеним оригінальним науковим дослідженням, яке за актуальністю, новизною, важливістю, достовірністю, а також практичною цінністю одержаних наукових результатів відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України №40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій» та вимогам Порядку присудження та 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.

Офіційний опонент,
заступник директора з наукової роботи
Інституту біології, хімії та біоресурсів,
завідувач кафедри молекулярної
генетики та біотехнології
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича
доктор біологічних наук, професор
заслужений діяч науки і техніки України

Р.А. Волков

