

В І Д Г У К

офіційного опонента на дисертаційну роботу Ющука Олександра Сергійовича на тему: “Генетичний контроль біосинтезу тейкопланіну в *Actinoplanes teichomyceticus*”, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Актуальність теми дисертації. На сьогоднішній день антибіотики належать до числа основних продуктів сучасної біотехнології та активно застосовуються в медицині та ветеринарії. Більшість відомих антибіотиків продукують актиноміцети, що є одними з найчисельніших і найбільш розповсюджених ґрунтових бактерій. Вивчення механізмів регуляції вторинного метаболізму до якого належить біосинтез антибіотиків є однією з центральних проблем молекулярної генетики та біотехнології мікроорганізмів. Визначення нуклеотидних послідовностей геномів цієї групи мікроорганізмів виявило десятки генів, продукти яких, ймовірно, задіяні в регуляції синтезу тих чи інших антибіотиків. Однак, молекулярні механізми генетичного контролю біосинтезу більшості антибіотиків є недостатньо вивченими. Дана робота присвячена дослідженню регуляції біосинтезу глікопептидного антибіотику тейкопланіну в *Actinoplanes teichomyceticus*. Цей антибіотик розглядаються як перспективний для лікування гострих заражень, спричинених грам-позитивними мультирезистентними бактеріями, зокрема метицилін-резистентними штамами *Staphylococcus aureus*. Хоча кластер генів біосинтезу тейкопланіну секвеновано, багато особливостей генетичного контролю його біосинтезу досі залишаються невідомими. Потребує дальших досліджень шлях-специфічна та глобальна регуляція біосинтезу тейкопланіну. Вивчення генів, що регулюють біосинтез цієї сполуки, поглибить розуміння процесів генетичного контролю глікопептидних антибіотиків та забезпечить можливість розробити підходи до конструювання їх продуцентів. Дисертаційна робота Ющука О.С. присвячена вивченню механізмів генетичного контролю біосинтезу тейкопланіну в *A. teichomyceticus*, а тому її актуальність не викликає жодного сумніву. Поставлені дисертантом мета і завдання роботи є логічними для розв’язання проблеми, а вибрані методичні прийоми відповідають сучасному стану світової науки.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Робота дисертанта є частиною фундаментальних досліджень науково-дослідної 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-203Н «Колекція культур мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка» (Договір №Н/309-2003 від 20.04.2015, 01.01.2015-01.12.2015) та БГ-41Нр «Універсальний генетичний механізм контролю продукції біологічно-активних речовин стрептоміцетами» (№ держреєстрації 0116U008070, 01.08.2016-31.07.2018); а також гранту ПНБТ-010115 «Молекулярна і клітинна біологія та біотехнологія», наданого компанією «Materials Phases Data Systems» (Швейцарія). Автор дисертаційної роботи є одним із виконавців вищезгаданих досліджень. Частину досліджень виконано автором дисертаційної роботи під час його наукового стажування в Міжфакультетському інституті мікробіології та інфекційної медицини Тюбінгенського університету (Німеччина, 2014–2015 рр.) за індивідуальним грантом DAAD (#57048249), а також під час наукового стажування на факультеті біотехнології та наук про життя університету Інзубрії (Італія, 2014 р.) за індивідуальним грантом від Consorzio Interuniversitario per le biotecnologie.

Новизна дослідження. Дисертаційна робота Ющука О.С. містить низку нових наукових результатів. Так, у результаті проведеної ним роботи встановлено функції генів *tei3**, *tei10**, *tei11**, *tei13** та *tei30**, продукти яких задіяні у реакціях глікозилування та ацилювання тейкопланінового аглікону. З'ясовано роль генів *A. teichomyceticus*, що кодують ферменти біосинтезу тирозину, який є попередником синтезу тейкопланіну. Встановлено, що в кластері генів біосинтезу тейкопланіну наявні 17 моногенних та поліцистронних транскрипційних одиниць. Доведено, що регулятори *Tei15** та *Tei16** безпосередньо контролюють експресію генів кластера біосинтезу тейкопланіну, при чому *Tei16** позитивно регулює експресію *tei15**. Докладно описано етапи життєвого циклу *A. teichomyceticus*. Вперше здійснено біоінформатичну реконструкцію мережі глобальних регуляторів у *A. teichomyceticus*. На основі дослідження найближчих гомологів *AdrA* з *A. teichomyceticus* отримано докази того, що наявний у всіх стрептоміцетів *AdrA*-опосередкований регуляторний механізм відсутній у *A. teichomyceticus*. Вперше встановлено, що до регуляції процесів морфогенезу *A.*

teichomyceticus залучені глобальні регулятори BldD, AbsB, WhiG, SsgB. За новизною досліджень робота повністю відповідає вимогам ДАК.

Теоретичне значення результатів досліджень. Біосинтез тейкопланіну в актиноміцетів – продукт тривалої еволюції, розуміння якої на сьогодні далеко не вичерпне, принаймні тому, що основний обсяг досліджень виконано на кількох модельних об'єктах. Про це кажуть і дослідження здобувача, який описав природні продуценти тейкопланіну; описав цікаві індуковані мутанти, генотип яких, однак, залишається не до кінця вивченим; вперше з'ясував роль генів, що кодують ферменти біосинтезу тирозину у синтезі тейкопланіну. Отримані результати мають важливе фундаментальне значення для розуміння особливостей генетичного контролю синтезу тейкопланіну в *A. teichomyceticus*. Очевидно, що глибше вивчення отриманих дисертантом даних відкриє нові факти генетичного контролю метаболізму тейкопланіну, які залишаються малодослідженими, зокрема нові регуляторні гени синтезу тейкопланіну позитивної і негативної дії.

Практичне значення результатів досліджень. Практичне значення роботи полягає, перш за все, в опрацюванні та оцінці ефективності використаних підходів для скерованого конструювання штамів *A. teichomyceticus* продуцентів тейкопланіну. Сконструйовані дисертантом рекомбінантні штами з посиленою експресією регуляторних генів біосинтезу тейкопланіну можуть слугувати цінним селекційним матеріалом у створенні промислових надпродуцентів цього антибіотику. Виявлені і вивчені у роботі гени, продукти яких задіяні в процесах модифікації аглікону тейкопланіну, можна використати для комбінаторного біосинтезу нових глікопептидних антибіотиків. Розробки, виконані дисертантом, захищені патентом України на корисну модель.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертація є цілісним дослідженням, її мета і завдання чітко сформульовано. Ющук О. С. застосував у своїй роботі сучасні методи молекулярної генетики, геноміки, генетичної та біохімічної інженерії, мікробіології, аналітичної біохімії та біоінформатики. Для досягнення завдань і мети роботи використано 13 основних штамів мікроорганізмів, на основі яких сконструйовано більше 40 рекомбінантних похідних, більше 40 плазмід; методами біохімічного аналізу визначено рівні продукції тейкопланіну. Положення, сформульовані в роботі, проілюстровані великою кількістю таблиць і рисунків. Список літератури включає 177 посилань. Результати опрацьовано статистично та обговорено з урахуванням сучасної наукової літератури. Виклад матеріалу відповідає

поставленій меті та завданням дисертаційної роботи. Зміст автореферату та основні положення самої дисертації – ідентичні. Висновки, зроблені здобувачем, логічно випливають з отриманих результатів. Тому достовірність положень та висновків й рекомендацій, сформульованих у дисертації, не викликає сумніву.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. За темою дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових праць, включаючи 5 статей у фахових наукових журналах, 1 стаття в збірниках наукових праць, 1 патент України на винахід, а також 8 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій. Сумарний імпаکت-фактор статей за темою дисертації складає 9,3. Публікації достатньо повно висвітлюють основні положення дисертаційної роботи і опубліковані у фахових журналах. Здобувач доповів матеріали дисертаційної роботи на багатьох вітчизняних наукових конференціях, з'їздах і симпозиумах.

Зауваження щодо дисертації:

1. В результатах досліджень при конструюванні штамів з надекспресією цільових генів не було представлено прямих доказів підвищення експресії відповідних генів (наприклад із застосуванням напівкількісної ПЛР із зворотною транскрипцією, що широко використовувалася у даній роботі).

2. У розділі 3.3.1, не зрозуміло доцільності отримання нокауту та надекспресії гена *tei31**, адже дисертантом показано відсутність експресії цього гена при культивуванні штаму дикого типу в середовищі ТМ1, в якому спостерігається продукція тейкопланіну.

3. Розділ 3.4.4 цікаво було би збагатити біохімічною характеристикою трансформантів з підвищеною експресією *tei14**, зокрема визначити питому активність DAPH-синтази та внутрішньоклітинний вміст тирозину.

4. Оригінальним виглядає підхід, описаний у розділі 3.4.5, в якому для зниження активності префенатдегідратаз підвищували експресію відповідних *PDT* генів. Чи не простіше було би знизити експресію цих генів? Дисертант твердить про переспрямування префенату в біосинтез тирозину, проте прямих доказів цього не наведено, адже внутрішньоклітинні концентрації фенілаланіну та тирозину не визначали. Чи додавання тирозину до середовища стимулює продукцію тейкопланіну?

5. Слід обговорити, чому у висновку 7 дисертант зараховує $AdpA_{AT80}$, та $AdpA_{AT3}$ до позитивних регуляторів біосинтезу тейкопланіну, проте оминає $AdpA_{AT19}$, незважаючи на стимуляцію спорогенезу та продукції актинородину при гетерологічній експресії гена $adpA_{AT19}$ у *S. coelicolor*, а також слабкій, але помітній експресії $adpA_{AT19}$ в споруючих культурах *A. teichomyceticus*, вирощених на середовищі ISP3.

6. У розділі 3.6.3.1, що стосується вивченню функцій гена $bldD_{AT}$ як негативного глобального регулятора, що блокує формування спорангіїв, досліджувався вплив надекспресії цього гена в *A. teichomyceticus*. Перспективним, в сенсі підвищення продукції тейкопланіну, виглядає отримання делеції гена $bldD_{AT}$ або зниження його експресії.

7. У розділах 3.6.3.2 та 3.6.4 описано конструювання штамів з посиленою експресією генів $whiG_{AT}$, $ssgB_{AT}$, проте продукцію тейкопланіну у цих штамів не визначали, чому?

Зазначені недоліки стосуються головно оформлення дисертації, не впливають на висновки роботи та не знижують її загальної високої позитивної оцінки.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці. Результати дисертаційної роботи можуть бути використані на підприємствах біотехнологічного профілю, що виробляють антибіотики; у навчальних закладах України різного профілю під час підготовки фахівців з молекулярної генетики, мікробіології та біотехнології.

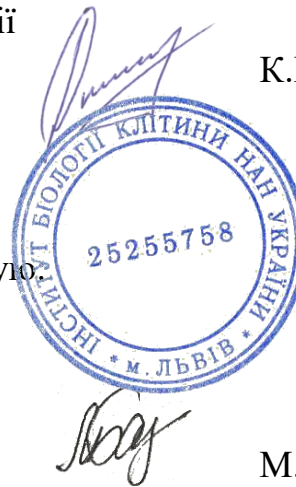
Висновок про відповідність дисертації вимогам Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника. Виходячи з вищенаведеної оцінки дисертації, вважаю, що за актуальністю теми, науковою новизною, важливістю і значенням отриманих результатів для теорії й практики, високим методичним рівнем проведених фундаментальних досліджень, широким висвітленням їх у фахових виданнях та матеріалах наукових форумів, зв'язком з державними програмами та іншими позитивними якостями вона відповідає вимогам п. 11, 12 Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 №567, а її автор, Ющук Олександр Сергійович, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю – 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук, с. н. с.
завідувач лабораторії метаболічної інженерії
Інституту біології клітини НАН України

К.В. Дмитрук

м. Львів, 1 грудня 2017 р.

Підпис д. б. н. Дмитрука К.В. засвідчую



Учений секретар
Інституту біології клітини НАН України
канд. біол. наук

М.Л. Барська