Голові спеціалізованої докторської вченої ради
ДП «Інститут харчової біотехнології та геноміки»
НАН України,
докторці біологічних наук, професорці,
чл.-кор. НАН України,
Аллі Ємець

ВІДГУК

офіційного опонента – докторки біологічних наук, професорки, чл.- кор. НАН України, головної наукової співробітниці Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України Галини Іутинської на дисертацію Олександра Ющука «Генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків», подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Актуальність обраної теми дисертаційного дослідження. З моменту відкриття і до нинішнього часу увага науковців, фахівців в галузях медицини, ветеринарії і рослинництва постійно зосереджена на антибіотиках. Хоча подекуди лунають заяви про те, що ера антибіотиків минула, настає ера пробіотиків і пребіотиків, все ж таки антибіотики залишаються найбільш дієвим і ефективним засобом боротьби з інфекційними захворюваннями людей, тварин і рослин. Зважаючи на появу антибіотикорезистентних штамів інфекційних агентів, пошук нових і модифікація широко вживаних антибіотиків залишаються актуальними.

Серед мікробних продуцентів антибіотиків найбільш перспективними є актиноміцети. Маючи великі хромосоми (у декілька млн. п.н.) представники цього порядку бактерій мають здатність продукувати одночасно широкий спектр біологічно речовин: антибіотики, стероли, вітаміни та ін. Антибіотики є макромолекулярними сполуками, синтез яких забезпечується багатьма біохімічними реакціями за участю низки ферментів, які кодуються хромосомними генами, при цьому синхронна експресія цих генів забезпечується кластерами біосинтетичних генів. Останні містять як біосинтетичні гени, так і гени стійкості, експорту, синтезу попередників та регуляторні гени. Актуальними у цій галузі є вивчення функціонування кластерів біосинтезу антибіотиків. Саме дослідження особливостей функціонування кластерів біосинтетичних генів, які у кожного продуценту є не тільки видоспецифічними, але і штамоспецифічними, дає можливість підвищувати продукцію антибіотиків, зокрема, впливаючи на регуляторні та активуючи мовчазні гени. Такі генетичні маніпуляції дають можливість отримувати надпродуценти антибіотиків. Проте багато питань з цієї проблеми залишаються мало дослідженими і невирішеними. Зокрема, не визначено основні методичні підходи для здійснення генетичних маніпуляцій із продуцентами антибіотиків, не розроблені теоретичні і практичні підходи до активації мовчазних генів. Поодинокі роботи присвячено геномному скринінгу

кластерів генів біосинтезу антибіотиків, але це є ефективний шлях пошуку нових перспективних штамів. Дуже актуальною є проблема появи антибіотикорезистентних штамів патогенів. Незважаючи на значну увагу дослідників і велику кількість робіт, ця проблема донині залишається невирішеною

Враховуючи актуальність перелічених вище питань, здобувач чітко сформулював мету і визначив завдання роботи. Метою роботи було вивчити генетичні механізми регуляції біосинтезу деяких пептидних та полікетидних антибіотиків. Для реалізації мети роботи було сформульовано 9 завдань, які необхідні для її вирішення: 1) вивчити філогеноміку AdpA-подібних глобальних позитивних регуляторів і дослідити властивості інших компонентів *adpA*-опосередкованого регуляторного каскаду на моделі *Streptomyces albus* (=*albidoflavus*) J1074;2) розробити набір методів для генно-інженерних маніпуляцій із *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504 – потенційного продуцента салінамід-подібного пептидного антибіотика; 3) розробити набір методів для генно-інженерних маніпуляцій та експресії гетерологічних генів в *Actinoplanes rectilineatus* NRRL B-16090 – потенційного продуцента ГПА; 4) створити підходи для створення надпродуцентів промислово-важливого ГПА A40926 в *Nonomuraea gerenzanensis* ATCC 55076; 5) дослідити потенціал *Nonomuraea coxensis* DSM 45129 до продукції нових ГПА; 6) побудувати філогенетичну модель еволюції КБГ ГПА, з акцентом на пошук нових КБГ подібних до комплестатину; 7) вивчити *adpA*-опосередкований глобальний генетичний контроль продукції ландоміцину А та способи активації інших вторинних метаболітів у *Streptomyces cyanogenus* S136, як моделі активації мовчазних КБГ; 8) вивчити механізми стійкості до ГПА в продуцента тейкопланіну *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121; 9) здійснити порівняльний філогеномний аналіз розповсюдження генів стійкості до ГПА серед бактерій, з метою виявлення вихідного резервуару цих генів та вивчення шляхів їх розповсюдження

У роботі сформульовано об'єкт дослідження – механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків, гени стійкості до глікопептидних антибіотиків. Предметом дослідження були кластери біосинтетичних генів глікопептидних і полікетидних антибіотиків, їх шляхспецифічні регуляторні гени; регуляторні гени *adpA*-опосередкованого каскаду стрептоміцетів – *adpA*, *bldA*, *miaA*, *miaB*; гени регуляторів YtrA-підродини актинобактерій; системи для гетерологічної експресії генів; регуляторні гени біосинтезу хлоробіоцину *novG* і *cloG*; гени стійкості до тейкопланіну в *A. teichomyceticus*; гени стійкості до ГПА бактерій; гени експортерів пептидних антибіотиків.

Зв'язок наукової роботи з науковими планами, темами. Дисертаційну роботу виконано 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 т-вом 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) М/18-2017 «Плейотропні транскрипційні регулятори родини AdpA як знаряддя відкриття нових природних біоактивних сполук», М/26-2018 «Плейотропні транскрипційні регулятори родини AdpA як знаряддя відкриття нових природних біоактивних сполук». Частину 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 був удостоєний Премії Верховної Ради України молодим ученим за 2021 рік (постанова ВРУ № 2833-IX від 13 грудня 2022 року).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їх достовірність. Формулювання мети та задач роботи відповідають темі дисертації. Методи, обрані для вирішення поставлених задач, є сучасними, адекватними та інформативними. Написаний огляд літератури демонструє розуміння здобувачем сучасного стану досліджень за темою. Це дозволило йому виокремити проблеми та знайти підходи до їхнього вирішення. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій підтверджуються комплексним підходом до вирішення поставлених задач, репрезентативною кількістю експериментів, статистичною обробкою результатів досліджень, застосуванням біоінформатичних підходів. Отже, усі висунуті на захист наукові положення є обґрунтованими, висновки добре аргументовані і походять з суті проведених досліджень та отриманих результатів, мають наукову новизну. Висновки повною мірою відповідають отриманим результатам. Результати дисертаційного дослідження є достовірними та об'єктивними.

Структура дисертаційної роботи має логічний характер, сформована як наукова праця на правах наукової доповіді за сукупністю статей. Структура дисертаційного дослідження є логічно узгодженою, а його характер – комплексним. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів досліджень, 6 розділів експериментальних досліджень, висновків, переліку використаних джерел та додатку, який містить список публікацій здобувача. Розділами дисертації є короткі резюме дослідження до кожного розділу та додані публікації здобувача.

Перший розділ роботи «Огляд літератури» представлено у публікаціях: розділі «Глікопептидні антибіотики: генетика, хімія і нові підходи до скринінгу» у монографії Rai, R.V., Bai, J.A. (eds.) Natural products from *Actinomycetes*., Singapore. Видавництво Springer, а також у 4 оглядових статтях.

В огляді сучасної літератури із визначених автором питань окреслено здобутки науковців, які працювали над дослідженнями глікопептидних і полікетидних антибіотиків та наголошено на важливості вивчення їх біосинтезу. Серед найважливіших питань виділено можливість отримати інформацію про регуляторні механізми, що контролюють продукцію зазначених антибіотиків, та про шляхи маніпуляції з біосинтетичними генами, створити нові практично цінні продукти, а також передбачити шляхи розвитку антибіотикорезистентності серед патогенів. Підкреслюється, що інформація про гени глікопептидних антибіотиків може бути використана для пошуку нових сполук шляхом біоінформатичного аналізу. Узагальнення літературних даних дало змогу автору виокремити недосліджені аспекти проблеми і зосередити свою роботу саме на цих питаннях.

Другий розділ «Матеріали та методи дослідження» викладено послідовно, відповідно до поставлених у роботі завдань. Наведено перелік основних методів досліджень, використаних у роботі. Для виконання мікробіологічних методів досліджень описано умови культивування різних штамів бактерій; визначення їх антагоністичних властивостей, Серед генетичних і генно-інженерних методів досліджень описано плазміди і способи їх перенесення у вегетативні клітини чи спори стрептоміцетів, охарактеризовано методи горизонтального агарозного гель-електрофорезу, виділення плазмідної і хромосомної ДНК, виділення сумарної РНК і синтез кДНК, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР); секвенування геномів актиноміцетів. Описано біохімічні методи досліджень – визначення β-глюкуронідазної активності, аналіз антибіотиків (ландоміцини, люцензоміцин, A40926 і A50926), афінна хроматографія. Статистична обробка та математичний аналіз отриманих результатів проведені з використанням сучасних методів, адекватних поставленим завданням. Застосовані біоінформатичні методи досліджень – аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, анотація генів, пошук та характеристика кластерів біосинтетичних генів, моделювання біосинтетичних шляхів *in silico*, філогенетичний аналіз амінокислотних та нуклеотидних послідовностей. Застосування комплексу методів дозволило отримати достовірні результати.

Третій розділ роботи присвячено плейотропним регуляторам морфогенезу і вторинного метаболізму стрептоміцетів, що належать до *adpA*-опосередкованого каскаду і YtrA-підродини, як знаряддя для контролю продукції антибіотиків. Вивченню гену *adpA* присвячено багато робіт, оскільки він є найважливішим глобальним регулятором біосинтезу антибіотиків у стрептоміцетів. Проте мало дослідженою залишається філогенія цього гену. З використанням бази даних GenBank автор здійснив пошук ортологів AdpA у стрептоміцетів, Серед існуючих 390 послідовностей у 91 геномі стрептоміцетів було знайдено представників ортологічної групи.

Автором було висунуто припущення, що ДНК-зв'язувальний домен AdpA здатний функціонувати без димеризаційного і це може вести до розширення можливостей зв'язування такого окремого домена в геномі. Для перевірки цього припущення було створено вектори для надекспресії генів, що кодують ортологи *adpA* або сегментів цих же генів, які кодують лише ДНК-зв'язувальний домен. Отримані вектори перенесено в штам *S. coelicolor* A3(2) з нокаутом гена, який кодує формування повітряного міцелію і споруляцію. Виявлено, що введення повних генів відновлювало утворення спор, Це вказувало на те, що всі ці регулятори мають когерентні властивості. Отже, експериментально було підтверджено вихідну гіпотезу автора: наявність димеризаційного домена не обов'язкова для функціонування AdpA.

Для того, щоб досягти функціонального стану тРНК досліджувані стрептоміцети, було піддано різноманітним посттрансляційним модифікаціям. Було створено плазміди pSAGA і pSAGAt, які перенесли в клітини стрептоміцетів штамів *S. albidus* J1074 і Δ*miaA*. Порівнявши β-глюкуронідазну активність отриманих рекомбінантних штамів виявили, що модифікація тРНК, яку забезпечує фермент MiaA, є критичною для правильного розпізнавання тРНК і трансляції TTA-вмісних генів.

Іншою важливою родиною плейотропних регуляторів продукції антибіотиків і морфогенезу стрептоміцетів є YtrA-підродина, один із них – LndYR – є залученим в регуляції біосинтезу *S. globisporus* 1912 полікетидного антибіотика ландоміцину Е. Вивчено особливості розповсюдження та філогенії YtrA-регуляторів в актинобактерій, а також їх властивості у модельного стрептоміцета *S. coelicolor* M145. Проаналізовано всі доступні в базі даних GenBank геноми актинобактерій на наявність гомологів. Всього виявлено 17 гомологів в 6 геномах підкласу *Coriobacteridae*, 3 гомолога в 2 геномах підкласу *Rubrobacteridae* і 76 гомологів в 80 геномах підкласу *Actinobacteridae*. Вивчення геномного контексту та філогенії знайдених генів показало, що ці гени найчастіше колокалізовані з генами ABC-транспортерів. У модельного штаму *S. coelicolor* було знайдено три гени YtrA-регуляторів, що належали до різних клад. Не було виявлено радикального впливу відсутності цих генів на продукцію антибіотиків та морфогенез, Це дало змогу припустити, що YtrA-регулятори стрептоміцетів забезпечують адаптивну мінливість організмів, але не відіграють ключової ролі у синтезі антибіотиків.

У четвертому розділі викладено підходи до генно-інженерних маніпуляцій із *Actinoplanes rectilineatus* NRRL B-16090 і *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504. Вибрано було саме ті штами, в геномах яких знайдено потенційні кластери біосинтетичних генів пептидних антибіотиків. Доступність цих штамів для генно-інженерних маніпуляцій раніше або не вивчалася, або описана як надзвичайно складний об'єкт. Робота проводилась зі споровим матеріалом. Для того, щоб знайти оптимальні умови споруляції, вивчено морфологію *Actinoplanes rectilineatus* за умов росту на різних агаризованих середовищах. Визначено, що спорангії формуються цим штамом на доволі поширеному поживному середовищі ISP3, але за умов пролонгованого культивування більш як 10 діб. Наступними етапами було

отримання концентрованих спорових суспензій, використання інтегративних і реплікативних векторів та здійснення перенесення плазмід методом міжродової кон'югації з використанням клітин *E. coli* ET12567 pUZ8002+ як донорів, а спор штаму NRRL B-16090 – як клітин-реципієнтів. У результаті розробленої методики частота перенесення pSAGA (система інтеграції φC31) становила прибл. 10^{-3}, а pKAGA1 (на основі pSG5 реплікона) – прибл. 10^{-5}. Проведені маніпуляції показали, що промотори *aac(3)IVp*, *moeE5p* і *tei2p* забезпечують сильну експресію гена *gusA*, а отже є ефективними знаряддями для надекспресії генів в *Actinoplanes rectilineatus*.

У роботах із *S. roseochromogenes* NRRL 3504 було використано не трансформацію протопластів, яка частіше всього використовується у лабораторній практиці, а проведення генетичних маніпуляцій зі споровим матеріалом, у результаті чого вдалося успішно перенести плазміди pSAGA (φC31), pRAGA1 (φBT1), pSoAGA2 (VWB1) і pKAGA1 (pSG5). З використанням суїцидних плазмід було проведено інсерційний нокаут генів та отримано рекомбінантний штам, не здатний до продукції хлоробіоцину. Цей штам було використано для подальших досліджень, зокрема для вивчення ролі елементів *adpA*-опосередкованого регуляторного каскаду (генів *adpA* і *bldA*) у продукції антибіотиків. Вектори було перенесено у рекомбінантний штам, не здатний до продукції хлоробіоцину. Всі отримані рекомбінанти надпродукували хлоробіоцин. Найвищі показники продукції продемонстрували рекомбінанти, які несли *cloG* і *novG* у складі pGCymRP21, продукуючи в 20 і 32 рази більше хлоробіоцину, ніж вихідний штам. Активність продукування становила 169 і 239 мг/л, що є найвищим зареєстрованим в літературі показником продукції хлоробіоцину.

П'ятий розділ присвячено дослідженню генів, що контролюють продукцію глікопептидних антибіотиків бактеріями *Nonomuraea gerenzanensis* ATCC 39727. Цей штам виділений порівняно недавно (Marcone, Binda, 2016) італійськими дослідниками, з якими і працював Олександр Сергійович, проводячи генетичні дослідження продуценту. Ця культура цікава тим, що продукує антибіотик A40926, який є попередником напівсинтетичного клінічного глікопептидного далбаванцину, що використовують в клініці для лікування інфекцій шкіри, спричинених стійкими до антибіотиків патогенами. Тому важливим є вивчення можливості застосування систем експресії генів для створення надпродуцентів A40926 в *N. gerenzanensis*. Оскільки aac(3)IVp було ідентифіковано автором як найактивніший конститутивний промотор для *Nonomuraea* spp., його використали для надекспресії регуляторних генів dbv3 і dbv4. Експериментально показано, що продукція антибіотика A40926 досягала піку після 120 год росту у рекомбінантних варіантів *N. gerenzanensis* pSAD3+ (прибл. 500 мг/л) і pSAD4+ (майже 650 мг/л), Отримані результати продемонстрували створення і ефективне застосування нових систем експресії генів в бактерій роду *Nonomuraea*, що дозволило створити надпродуцентів промислово-важливого антибіотика A40926.

Проведене секвенування і створення збірки генома дозволило виявити 26 потенційних кластерів біосинтетичних генів, включно з новим кластером

глікопептидних антибіотиків. Було визначено новий кластер та проведено моделювання біосинтетичного шляху нового антибіотику A50926, синтезованого *N. coxensis* DSM 45129, ідентифіковано його продукцію, створено надпродуцентів, а також продуцента A40926 на основі *N. coxensis*.

У шостому розділі продемонстровано особливості порівняльної філогеноміки кластерів генів біосинтезу глікопептидних антибіотиків. Роботу виконано з використанням можливостей біоінформатики. Проведено дослідження кластерів генів біосинтезу глікопептидних антибіотиків різних типів, зосередивши основну увагу на антибіотиках V типу. Глікопептидні антибіотики типів I- IV активно діють на Грам-позитивні бактерії шляхом зв'язування ліпіду II, у той час як у антибіотиків типу V (такі як комплестатин) мішенню дії є автолізини – ферменти утилізації компонентів клітинної стінки бактерій. Порівнявши 17 модельних кластерів генів біосинтезу глікопептидних антибіотиків (включно із КБГ біосинтезу комплестатину – com), дисертант дійшов висновку, що у типу V вони еволюційно відмежовані від типів I-IV. Далі проаналізовано 2664 геномів стрептоміцетів в пошуках кластерів біосинтетичних генів глікопептидних антибіотиків, подібних до комплестатину, та виявлено такі повні послідовності кластерів у 33 геномах. Моделювання *in silico* біосинтетичних шляхів, кодованих в знайдених кластерах, дозволило зробити припущення про імовірність синтезу не тільки комплестатину, а і нових гіпотетичних антибіотиків норкомплестатину, N-малоніл-норкомплестатину, N-ацетил-норкомплестатину. Отриману послідовність проаналізували за допомогою antiSMASH 5.0. Отримані у шостому розділі результати вказують на стрептоміцетів як на джерело нових ГПА антибіотиків типу V, подібних до комплестатину. Отримані результати дозволять цілеспрямовано проводити серед стрептоміцетів пошук продуцентів нових антибіотиків типу V, подібних до комплестатину.

У сьомому розділі визначено шляхи регуляції продукції антибіотиків в *Streptomyces cyanogenus* S136 як моделі для визначення шляхів активації мовчазних кластерів біосинтетичних генів.

Експерименти проведено зі штамом *S. cyanogenus* S136 - продуцентом полікетидного антибіотика ландоміцину A (кластер – lan), який має деякі протиракові властивості. Вивчено роль глобального позитивного регуляторного гену adpA, для чого секвеновано геном цього штаму. Отримана послідовність репрезентувала лінійну хромосому розміром 8773899 п.н., на якій було анотовано 7700 генів, у тому числі ідентифіковано 41 кластер біосинтетичних генів для різноманітних вторинних метаболітів (включно із ландоміцином – lan). В геномі дослідного штаму ідентифіковано ортолог AdpA (названий AdpAscy), а в нуклеотидній послідовності lan виявлено потенційні сайти зв'язування для AdpA, у тому числі і той, що кодує ключовий шлях-специфічний активатор транскрипції всіх структурних генів lan, але у даного продуцента він втратив свою функціональність. Тому ряд adpA-генів з добре вивчених видів *Streptomyces* (*S. coelicolor* M145, *S. ghanaensis* (=viridosporus) ATCC 14672, *S. clavuligerus* ATCC 27064 і *S. albus (=albidoflavus)* J1074) було надекспресовано в *S. cyanogenus* S136. Гетерологічні *adpA*-гени справляли

позитивний вплив на синтез ландоміцину А, продукція якого рекомбінантними штамами становила в середньому 275 мг/л, що перевищувало продукцію дикого типу більше ніж у 15 разів. Отже, результати продемонстрували, що застосування функціональних алелів *adpA*, які походять з гетерологічних господарів, є ефективним для підвищення продукції ландоміцину А в *S. cyanogenus*. За допомогою такого підходу вдалося активувати синтез інших метаболітів, таких як пігменти та антибіотик люцензоміцин. Користуючись наявними відомостями про біосинтез, у дисертації було реконструйовано біосинтетичний шлях синтезу люцензоміцину. Було доведено, що у дикого типу (S136) AdpA посилює експресію генів як ландоміцину А, так і люцензоміцину.

Таким чином, проведені дослідження показали, що різні алелі гена adpA можуть бути ефективними для активації мовчазних кластерів генів біосинтезу антибіотиків у *S. cyanogenus* S136, а, ймовірно, і в інших стрептоміцетів.

Восьмий розділ присвячено вивченню генів стійкості до глікопептидних антибіотиків у бактерій. У роботах цього розділу дисертант виходив з даних літератури про те, що гени стійкості до антибіотиків у актиноміцетів-продуцентів, ймовірно, є джерелом генів стійкості у патогенів. Це дозволило би робити прогнози про механізми стійкості до глікопептидних антибіотиків у патогенних бактерій. Створення детальної моделі функціонування генів стійкості (або *van* генів) проводили на моделі *A. teichomyceticus* ATCC 31121 – продуцента клінічно-важливого тейкопланіну. Виявилось, що експресія *van* генів виявилася незалежною і від шлях-специфічного регулятора біосинтезу тейкопланіну.

В роботі було створено доволі повну модель функціонування генів стійкості до глікопептидних антибіотиків в *A. teichomyceticus*. Згідно моделі гени стійкості згруповані у два оперони: *tei2-3-4* (ортологи *vanRS* + ген дигідрофолат редуктази) і *tei7-6-5* (ортологи *vanHAX*). Експресія обох оперонів протягом всього життєвого циклу забезпечена сильними і конститутивними промоторами, незалежними від шлях-специфічної регуляції біосинтезу тейкопланіну. Гістидинова кіназа Tei3 має конститутивну фосфорилазну активність, а її сенсорний домен розпізнає не тейкопланін, а споріднений глікопептидний антибіотик A40926. Практично важливим є те, що охарактеризовано промотори tei2p і tei7p як потенційні інструменти для надекспресії генів в *A. teichomyceticus*, а також було створено тест-системи на основі *S. coelicolor* для виявлення ванкоміцину в нг-діапазоні.

Оскільки у роботі було виявлено, що гени стійкості до глікопептидних антибіотиків зустрічаються не тільки у продуцентів, а й в актиноміцетів, не здатних до їх продукції, досліджено розповсюдження і еволюцію генів стійкості до глікопептидних антибіотиків серед всіх актинобактерій - *van* гени виявлялися з частотою приблизно 13% і були знайдені в 900 геномах *Actinobacteria*. У подальшому проведено скринінг геномів всіх бактерій, доступних в базі даних GenBank на 2022 рік. Виявлено, що гени стійкості до ГПА знайдено у представників класів Грам-позитивних бактерій *Bacilli, Clostridia, Erysipelotrichia* і *Ktedonobacteria*, а також у представників Грам-негативних бактерій – класу *Anaerolineae*. Аналізуючи філогенію цих генів,

описано ряд можливих шляхів горизонтального переносу генів стійкості до глікопептидних антибіотиків серед бактерій.

Наукова новизна положень, результатів та висновків дисертаційної роботи. Дисертаційне дослідження має самостійний системний, цілісний, характер та відзначається високим рівнем наукової новизни. Вперше проведено філогеномний аналіз AdpA-подібних регуляторів та визначено важливість і значення як окремих його доменів, так і інших компонентів *adpA*-опосередкованого регуляторного каскаду (на моделі *S. albus* (=*albidoflavus*) J1074). На моделі *S. coelicolor* A3(*2*) вперше вивчено функції YtrA-подібних регуляторів. Розроблено нові підходи і методи генно-інженерних маніпуляцій для продуцента хлоробіоцину і потенційного продуцента салінамід-подібного пептидного антибіотика *S. roseochromogenes* NRRL 3504. Вперше розроблено генно-інженерні маніпуляції із потенційним продуцентом нового глікопептидного антибіотика *A. rectilineatus* NRRL B-16090. Розроблено нові підходи до покращення біосинтезу клінічно важливого антибіотика A40926, який продукує *N. gerenzanensis* ATCC 55076. Відкрито та описано біосинтез нового антибіотика A50926 – в *N. coxensis* DSM 45129. Визначено нові аспекти позитивного впливу функціональних алелів *adpA* на біосинтез ландоміцину А в *S. cyanogenus* S136, вперше показано їх важливість для активації мовчазних генів. Вперше описано кластер біосинтезу полікетидного антибіотика люцензоміцину. Побудовано повну модель функціонування генів стійкості до тейкопланіну в *A. teichomyceticus* ATCC 31121; вперше охарактеризовано глобальне розповсюдження генів стійкості до ГПА на основі даних порівняльної геноміки.

Практичне значення отриманих результатів. У виконаній роботі автор має здобутки важливого практичного значення. Серед них слід відмітити такі: створення надпродуцентів хлоробіоцину, які за рівнем його продукції перевершують аналогів, описаних в літературі; розробка практичних підходів для надекспресії генів в штамах *Actinoplanes* spp. і *Nonomuraea* spp., створення надпродуценту промислово-важливого антибіотика A40926 на основі *N. gerenzanensis* ATCC 55076, що переважає за продуктивністю описаних в літературі, отримання альтернативного продуценту A40926 на основі *N. coxensis* DSM 45129. Визначено вірогідні шляхи для активації мовчазних генів синтезу антибіотиків, зокрема люцензоміцину в *S. cyanogenus* S136 – на ці результати автор отримав Патент України на винахід. Автором створено повний опис генів стійкості до ГПА серед усіх бактерій, що є важливим у визначенні поширення множинно-резистентних патогенів.

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях. Результати дисертаційного дослідження опубліковані у фахових статтях, з них 10 статей у журналах Q 1 з IF 4 - 5,6, 6 статей у журналах Q 2 з IF 2,9 - 6,2 і 3 статті у журналах Q 3 з IF 2,6- 3,9. Статі у міжнародних виданнях індексується наукометричними базами даних SCOPUS, Web of Science, також опубліковано розділ у міжнародній монографії видавництва Springer. Отримано 1 патент та 3 роботи опубліковано у фаховаих виданнях України. Апробацію матеріалів дисертації підтверджено участю у міжнародних та українських конференціях

(19). Це засвідчує визнання результатів дисертаційного дослідження вітчизняною та міжнародною фаховою науковою спільнотою.

Оцінка змісту дисертації. Дисертація Олександра Ющука викладена на 460 друкованих сторінках. Структура дисертації повністю відповідає визначеним автором меті і завданням дослідження. Список використаної літератури включає 1549 посилань. Робота містить 127 рисунків і 29 таблиць (в публікаціях здобувача).

Анотації українською та англійською мовами відповідають положенням, що викладені в тексті дисертації та не містять даних, які були б відсутні в основному тексті роботи і оформлені відповідно до діючого Порядку присудження наукових ступенів.

З аналізу змісту дисертації мною, як офіційним опонентом, вбачається дотримання вимог академічної доброчесності в повному обсязі. Робота містить посилання на згадані у тексті джерела інформації, автором дотримано вимоги норм законодавства про авторське право, надано повну інформацію про результати наукової діяльності, а також використані методи досліджень.

Ідентичність змісту автореферату і основних наукових положень дисертації. У тексті автореферату відображено основні положення, зміст, результати і висновки виконаної Ющуком О.С. дисертаційної роботи. Зміст автореферату та основні положення дисертації є ідентичними.

Дискусійні положення, запитання та побажання щодо змісту дисертації. Дослідження виконано на високому рівні з використанням сучасних методик, текст дисертації викладено чітко і зрозуміло. Але деякі положення потребують уточнень.

Запитання і зауваження:

- У дослідженнях був використаний штам *S. coelicolor* M851. Як описує автор, цей штам був не здатний до формування повітряного міцелію і споруляції. Проте відомо, що здатність до утворення повітряного міцелію та споруляції у стрептоміцетів у значній мірі залежить від умов культивування. Наскільки стабільною була ця ознака у *S. coelicolor* M851? Чи проявляв цей штам реверсію до утворення повітряного міцелію при зміні різних поживних середовищ або інших умов культивування?
- Висновок про те, що ДНК-зв'язувальний домен AdpA може функціонувати без димеризаційного було підтверджено на здатності стрептоміцету відновлювати споруляцію і утворення повітряного міцелію. Проте не визначено, як відсутність потреби в димеризації буде впливати на біосинтез антибіотику.
- У дисертації виявлено консервативне положення TTA-кодона у межах ідентифікованої ортологічної групи. Проте у деяких ортологів TTA-кодон за даними автора знаходився в інших ділянках. Чи з'ясував автор, яке значення має положення цього кодону для функціонування AdpA-регуляторів або синтезу антибіотиків штамами, у геномі яких він був знайдений?
- Для проведення генетичних маніпуляцій було використано не протопласти, а споровий матеріал стрептоміцетів. Відомо, що при

утворенні спор відбуваються зміни білкових компонентів клітини з великою кількістю дисульфідних зв'язків, утворюється кортекс – товстий шар з комірчастою структурою. У спорі немає води у вільному стані, не відбуваються ферментативні реакції, нема дихання. Проте у спорі відносно великий вміст нуклеїнових кислот по відношенню до цитоплазми. Поясніть будь ласка, як відбувалось перенесення плазмід методом міжродової кон'югації з використанням клітин *E. coli* у спори актиноміцету з подоланням бар'єру спорової оболонки та відсутністю у спорі основних фізіологічних процесів. До того ж представники *Actinoplanes* утворюють спори, які мають джгутики і є рухливими.

- Дисертантом проаналізовано більш як 2,5 тисячі геномів стрептоміцетів для пошуку подібних кластерів синтезу комплестатину і виявлено лише 33 повних подібних кластери. Моделювання *in silico* імовірних біосинтетичних дозволило автору виказати припущення про можливість існування біохімічних аналогів комплестатину – норкомплестатину, N-малоніл-норкомплестатину, N-ацетил-норкомплестатину. Проте експериментальне підтвердження цієї гіпотези відсутнє, також не приведено доказів того, що існування таких сполук з хімічної точки зору можливе з урахуванням їхньої стабільності. Серед імовірних продуцентів вказано три види: *Streptomyces* sp. BA2, YIM 121038 і *S. spectabilis* NRRL 2792. Чи синтезують ці штами прогнозовані антибіотики у роботі не сказано. Бажано було би вказати, серед яких родів актиноміцетів перспективно проводити пошук продуцентів цих нових антибіотиків.
- При вивченні поширення генів стійкості до глікопептидних антибіотиків, було виявлено їх наявність як у актиноміцетів, так і представників інших класів бактерій. На думку автора джерелом генів стійкості до глікопептидних антибіотиків є самі актиноміцети-продуценти цих антибіотиків. Хоча така гіпотеза існує серед дослідників, проте докази цього все ж недостатньо переконливі. Не можна виключати інші шляхи виникнення антибіотикорезистентних штамів.
- У результаті проведених генетичних маніпуляцій дисертант отримав практично важливі надпродуценти антибіотиків – промислово-важливого антибіотика A40926 на основі *N. gerenzanensis* ATCC 55076, альтернативного продуценту A40926 на основі *N. coxensis* DSM 45129. люцензоміцину на основі *S. cyanogenus* S136. Наскільки стабільними є отримані продуценти при їх тривалих пересівах, тобто при можливому їх промисловому використанні?
- Результати проведеної роботи свідчать про її важливе практичне значення, зокрема, такі здобутки як створення надпродуцентів промислово-важливого антибіотика A40926, ландоміцину A, продуцента A40926 розроблено шляхи активації мовчазних генів. Хоча впровадження у виробництво в Україні цих здобутків поки неможливе унаслідок відсутності виробництва медичних антибіотиків, все ж необхідно було би оформити документи, що охороняють інтелектуальну власність шляхом

патентування. Серед усіх здобутків оформлено тільки один Патент України на винахід – на продуцента люцензоміцину в *S. cyanogenus* S136. Перераховані зауваження не мають принципового характеру і не змінюють загальної високої позитивної оцінки дисертаційної роботи Олександра Ющука.

Загальний висновок та оцінка дисертації. Дисертаційна робота Ющука Олександра Сергійовича є завершеною науковою працею, Актуальність обраної теми, застосування сучасних методів досліджень, обґрунтованість наукових положень, висновків, сформульованих у дисертації, їх достовірність та наукова новизна, повнота викладу в опублікованих працях свідчать про високий рівень представленої роботи, яка 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 на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук з наукової спеціальності 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент
докторка біологічних наук, професорка,
членкиня-кореспондентка НАН України,
головна наукова співробітниця
відділу загальної і грунтової мікробіології
Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України — Галина Іутинська

Підпис Іутинської Г.О. засвідчую:
учений секретар Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України — Олена Андрієнко
канд.біол.наук

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ім. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО
Ідентифікаційний код 05417087
м. Київ