

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», академік НАН України, д.б.н., проф. Ярослав БЛЮМ

«14» березня 2023 р.

ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника Львівського національного університету імені Івана Франка **Ющука Олександра Сергійовича** на тему «**Генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків**», що подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Призначені рішенням вченої ради Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» (протокол № 4 від 15 березня 2023 року) рецензенти, а саме:

- Шульга Сергій Михайлович – заступник директора з наукової роботи, доктор біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія;

- Пірко Ярослав Васильович – завідувач відділом популяційної генетики, доктор біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика;

- Ісаснков Станіслав Валентинович – завідувач відділом рослинних харчових продуктів та біофортificaції, доктор біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика,

розглянувши докторську дисертацію Ющука Олександра Сергійовича «Генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків» (тема дисертації затверджена вченою радою Львівського національного університету імені Івана Франка від 01.03.2023, протокол №44/3), наукові публікації, в яких висвітлені основні наукові результати, а також результати розширеного фахового семінару відділу клітинної біології і біотехнології (від 22.03.2023 р., протокол №5) **ухвалили:**

1. Дисертаційна робота Ющука Олександра Сергійовича «Генетичні

механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків», представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика (09 Біологія), є кваліфікаційною науковою працею на правах наукової доповіді за сукупністю статей. За обсягом, актуальністю, рівнем наукової новизни та практичної цінності робота **відповідає** вимогам пунктів 7–9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 року.

Актуальність обраної теми дослідження. Поширення штамів патогенних мікроорганізмів, стійких до клінічних антибіотиків, які щорічно призводять до мільйонів захворювань, ставить нові виклики всесвітній системі охорони здоров'я. Актуальною є проблема пошуку нових антибіотиків і оптимізація продукції вже відомих сполук, а також вивчення генів і механізмів стійкості до антибіотиків. Більшість антибіотиків природного походження, активні проти грампозитивних, грамнегативних бактерій і патогенних грибів, походять із спорулюючих актинобактерій, здатних до формування міцелію, відомих під нетаксономічною назвою Актиноміцети (*Actinomycetes*). Актиноміцети – грампозитивні бактерії, що населяють ґрунтові біотопи. Геноми актиноміцетів несуть десятки кластерів біосинтетичних генів антибіотиків, які можуть слугувати потенційним джерелом нових сполук для боротьби із мультирезистентними патогенами.

У вивченні біосинтезу антибіотиків ключове значення має дослідження механізмів регуляції біосинтезу цих сполук, бо саме функціонування регуляторних генів визначає наскільки активно і за яких умов продукуватиметься певний антибіотик, як координуватиметься біосинтез антибіотика з ростом і морфогенезом культури продуцента та буде забезпечуватися його стійкість до власного антибіотика. Вивчення регуляторних механізмів біосинтезу антибіотиків включає аналіз геному продуцентів *in silico* для визначення кластерів біосинтетичних генів, експериментальне вивчення ролі генів глобальних і шлях-специфічних

регуляторів, їх застосування для створення штамів надпродуцентів антибіотиків.

Враховуючи те, що переважаюча більшість кластерів біосинтетичних генів антибіотиків в геномах актиноміцетів є мовчазними, використання регуляторних генів у більшості випадків слугує єдиним способом активації мовчазних кластерів біосинтетичних генів.

Пептидні і полікетидні антибіотики актиноміцетів характеризуються значною різноманітністю хімічних структур, яку забезпечує модульна організація нерибосомних пептидсинтаз і полікетидсинтаз – ключових ферментів біосинтезу цих сполук. Глікопептидні антибіотики визнані ВООЗ критично-важливими антибіотиками із найвищим пріоритетом для їх вивчення і нагляду за формуванням стійкості до глікопептидних антибіотиків у патогенів. Основну увагу Ющук О.С. зосередив на вивченні таких штамів-продуцентів пептидних і полікетидних антибіотиків: *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121 (продуцент тейкопланіну), *Actinoplanes rectilineatus* NRRL B-16090 (несе кластери біосинтетичних генів глікопептидних антибіотиків), *Nonomuraea gerenzanensis* ATCC 39727 (продуцент A40926), *Nonomuraea coxensis* DSM 45129 (продуцент A50926), *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504 (продуцент хлоробіоцину, несе кластери біосинтетичних генів нового пептидного антибіотика), *Streptomyces cyanogenus* S136 (продуцент ландоміцину А і люцензоміцину). Крім того, модифіковані методи для генетичних і генно-інженерних маніпуляцій із бактеріями-продуцентами.

Дослідження механізмів регуляції та активації біосинтезу антибіотиків, генів стійкості до глікопептидних антибіотиків, прикладний аспект зазначених досліджень для потреб селекції мікроорганізмів, генетичної інженерії, медицини, визначають актуальність роботи Ющука О.С.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. 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 дисертації, Ющуку О.С. присуджена Премія Верховної Ради України молодим ученим за 2021 рік (постанова ВРУ № 2833-IX від 13 грудня 2022 року).

Ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків, які сформульовані в дисертації. В дисертаційній роботі використані сучасні методи дослідження, зокрема: мікробіологічні методи досліджень (культивування мікроорганізмів, вивчення їх морфології методами світлової та сканувальної електронної мікроскопії (SEM), вивчення антибіотичних властивостей штамів методами пригнічення росту тест-культур);

біотехнологічні методи досліджень (культивування штамів актиноміцетів-продуцентів антибіотиків в умовах, наближених до промислових, в колбах Ерленмеєра або лабораторних ферментерах, вивчення динаміки росту культур, накопичення біомаси і антибіотиків); генетичні й генно-інженерні методи досліджень (отримання і вивчення рекомбінантних штамів бактерій, генетична трансформація *Escherichia coli*, кон'югаційне перенесення плазмід з донорських штамів *E. coli* до актиноміцетів; виділення плазмідної та хромосомної ДНК, виділення сумарної РНК та синтез кДНК, рестрикційний аналіз плазмідної ДНК, конструювання рекомбінантних молекул ДНК, горизонтальний гель-електрофорез ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, секвенування ДНК, напівкількісна полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією); біохімічні методи досліджень (кількісний та якісний аналіз продукції антибіотиків за допомогою тонкошарової хроматографії, високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та ВЕРХ із мас-спектрометрією чи тандемною мас-спектрометрією, екстракція антибіотиків, якісний і кількісний аналіз β -глюкуронідазної активності); біоінформатичні методи досліджень (аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, анотація генів, пошук та характеристика КБГ, моделювання біосинтетичних шляхів *in silico*, філогенетичний аналіз амінокислотних та нуклеотидних послідовностей).

Комплексне використання різноманіття сучасних методів і підходів, відтворюваність експериментального матеріалу дозволяє зробити висновок про обґрунтованість і достовірність отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше здійснено філогеномний аналіз AdpA-подібних регуляторів та продемонстровано важливість окремих доменів цього білка; вперше вивчено окремі компоненти *adpA*-опосередкованого регуляторного каскаду на моделі *S. albus* (= *albidoflavus*) J1074. Вперше вивчено функції YtrA-подібних регуляторів на моделі *S. coelicolor* A3(2).

Розроблено ефективні методи для генно-інженерних маніпуляцій

продуцента хлоробіоцину і потенційного продуцента салінамід-подібного пептидного антибіотика *S. roseochromogenes* NRRL 3504. Вперше розроблено набір знарядь для генно-інженерних маніпуляцій із потенційним продуцентом нового глікопептидного антибіотика *A. rectilineatus* NRRL B-16090.

Розроблено нові підходи до покращення біосинтезу клінічно важливого глікопептидного антибіотика A40926 в *N. gerezanensis* ATCC 55076.

Відкрито та описано біосинтетичний шлях нового глікопептидного антибіотика – названого A50926 – в *N. coxensis* DSM 45129. Показана роль функціональних алелів *adpA* для продукції ландоміцину А в *S. cyanogenus* S136, їх важливість як знарядь активації мовчазного вторинного метаболізму.

Вперше описано КБГ полікетидного антибіотика люцензоміцину.

Побудовано повноцінну модель функціонування генів стійкості до тейкопланіну в *A. teichomyceticus* ATCC 31121.

Вперше охарактеризовано глобальне розповсюдження генів стійкості до глікопептидних антибіотиків на основі даних порівняльної геноміки.

Практичне значення одержаних результатів. Створено надпродуцентів хлоробіоцину, які не мають аналогів, описаних в літературі, за рівнем продукції цього антибіотика. Створено бібліотеку плазмід для надекспресії генів в штаммах-продуцентах глікопептидних антибіотиків *Actinoplanes* spp. і *Nonomuraea* spp. Створено надпродуцентів промислово-важливого антибіотика A40926 на основі *N. gerezanensis* ATCC 55076, що за продуктивністю значно переважають описаних в літературі надпродуцентів A40926. Вперше на основі *N. coxensis* DSM 45129 методом гетерологічної експресії гена *dbv29* створено альтернативний продуцент A40926.

Доведена важливість різних алелів *adpA* для активації мовчазних кластерів біосинтетичних генів, зокрема кластерів біосинтетичних генів люцензоміцину в *S. cyanogenus* S136. Результати запатентовано (патент України на винахід). Проведено скринінг геномів мікроорганізмів (2-22-2-23 рр.) з генами стійкості до антибіотиків та запропонована оригінальна класифікація генів стійкості до глікопептидних антибіотиків, що є важливим

доповненням до нагляду за поширенням множинно-резистентних патогенів.

Відомості про проведення біоетичної експертизи дисертаційних досліджень. Біоетична експертиза матеріалів дисертаційної роботи Ющука О.С. «Генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків» проведена комісією з біоетики біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка (протокол 4/1 від 13.03.2023 р., додається). Зазначена дисертаційна робота виконана без порушень міжнародних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами.

Особистий внесок здобувача. Роботи здобувача, представлені в дисертації, збажуються на результатах отриманих ним особисто, або за його безпосередньої участі чи під його керівництвом. Мету, завдання дослідження, висновки було сформульовано разом із д.б.н., проф. В.О. Федоренком. Вивчення компонентів *adpA*-опосередкованого регуляторного каскаду в *S. albus* здійснювалося разом із к.б.н. О.Т. Кошлою (ЛНУ ім. І. Франка). Дослідження властивостей генів YtrA-регуляторів *S. coelicolor* було виконано разом із аспірантом О. Ципік (ЛНУ ім. І. Франка). Виділення та ВЕРХ-МС аналіз люцензоміцину було виконано разом із к.б.н. І.С. Осташ (ЛНУ ім. І. Франка) та групою професора Р. Зюсмута (Технічний Університет Берліна, Німеччина). Секвенування та анотація геномів актиноміцетів була здійснена у співпраці із групою професора Й. Каліновські (Університет Білефельда, Німеччина). ВЕРХ-МС аналіз нового глікопептидного антибіотика A50926 виконано у співпраці із докторами Е. Труманом і Н.-М. Віор (Джон Іннес Центр, Великобританія). Вивчення продукції глікопептидного антибіотика здійснювалося спільно з докторами філософії Ф. Беріні, Е. Біндою, А. Андрео-Відалем (керівником дисертації останньої був автор) (Університет Інзубрії, Італія). Сканувальна електронна мікроскопія актиноміцетів виконана спільно із к.ф.-м.н. Ю.Р. Дацюком (ЛНУ ім. І. Франка). Планування експериментів, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно з д.б.н., професором В.О. Федоренком, а також д.б.н. Б.О. Осташем (ЛНУ ім. І.

Франка), професорами Ф. Маріnellі (Університет Інзубрії, Італія), М. Бібом (Джон Іннес Центр, Великобританія), к.б.н. М. Рабик (ЛНУ ім. І. Франка), аспірантами С. Мельник і К. Жукровською (ЛНУ ім. І. Франка), з якими автор має спільні публікації.

З наукових праць, опублікованих у співавторстві, в дисертаційній роботі використано тільки ті ідеї та здобутки, що являються особистим внеском здобувача. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації доповідалися та обговорювалися на 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); XVII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», Львів (2021); Міжнародному онлайн конгресі «VAAM Workshop 2021», Тюбінген (2021); Міжнародному онлайн конгресі «ExpoBAC Zaragoza 2020», Сарагоса (2021); 3rd International Conference on Natural Products Discovery and Development in the Genomic Era, San Diego (2020); XV Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», присвяченій 135 річниці від дня народження Я. Парнаса, Львів (2019); 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); Міжнародній конференції «Integrative Biology & Medicine», Київ (2017); XII

Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», Харків (2017).

2. Дисертаційна робота Ющука О.С. містить особисто отримані здобувачем науково обґрунтовані результати, а кількість та якість наукових праць опублікованих за її матеріалами відповідають вимогам наказу МОН України № 1220 від 23 вересня 2019 року «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук».

За матеріалами дисертації опубліковано 44 наукові праці, із них 3 – у наукових фахових виданнях України, 20 – у зарубіжних наукових журналах, проіндексованих в міжнародних наукометричних базах даних Scopus і Web of Science, 19 тез доповідей вітчизняних та міжнародних наукових конференціях. Серед зазначених праць: 7 експериментальних статей у наукових виданнях, що належать до **Q1** Scimago; 6 експериментальних статей – у наукових виданнях **Q2** Scimago; 3 експериментальні статті – у наукових виданнях **Q3** Scimago; 4 літературні огляди у наукових виданнях, що належать до **Q1** Scimago; 3 експериментальні статті – у фахових виданнях України; один розділ монографії видавництва Springer і один патент України на винахід.

Публікації у періодичних виданнях **Q1 – Q3** дозволяють подання роботи на правах наукової доповіді за сукупністю статей.

Повнота висвітлення матеріалів дисертації в публікаціях.
Опубліковані роботи адекватно відображають основний зміст дисертації. Наукові праці, що розкривають основні наукові результати дисертації:

1. **Yushchuk O**, Zhukrovska K, Ostash B, Fedorenko V, Marinelli F (2022) Heterologous expression reveals ancient properties of Tei3 – a VanS ortholog from the teicoplanin producer *Actinoplanes teichomyceticus*. International journal of molecular sciences 23(24):15713. <https://doi.org/10.3390/ijms232415713> [IF 6,208; SCOPUS, WoS; Scimago **Q2** – 2022 Molecular biology] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку).

2. **Yushchuk O**, Ostash B (2022) Glycopeptide antibiotics: genetics,

chemistry, and new screening approaches. In: Rai, R.V., Bai, J.A. (eds.) *Natural products from Actinomycetes*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-6132-7_16 [розділ монографії] (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, написання розділу, створення ілюстрацій, підготовка розділу до друку).

3. **Ющук О**, Жукровська К, Федоренко В (2022) Філогенія білківекспортерів глікопептидних і деяких споріднених антибіотиків. Вісник Львівського університету. Серія біологічна 86:33-46. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2022.86.03> [фахове видання України] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, скринінг геномів і біоінформатичний аналіз, написання рукопису та підготовка статті до друку).

4. **Yushchuk O**, Zhukrovska K, Berini F, Fedorenko V, Marinelli F (2022) Genetics behind the glycosylation patterns in the biosynthesis of dalbaheptides. *Frontiers in chemistry* 10:858708. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.858708> [IF 5,545; SCOPUS, WoS; Scimago **Q1** – 2022 Chemistry] (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури і написання огляду, створення ілюстрацій, підготовка статті до друку).

5. **Ющук О**, Жукровська К, Федоренко В (2022) Поширення кластерів генів біосинтезу комплестатину та подібних сполук у представників роду *Streptomyces*. Фактори експериментальної еволюції організмів 30:133-140. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v30.1474> [фахове видання України] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, скринінг геномів і біоінформатичний аналіз, написання рукопису та підготовка статті до друку).

6. **Yushchuk O**, Binda E, Fedorenko V, Marinelli F (2022) Occurrence of *vanHAX* and related genes beyond the *Actinobacteria* phylum. *Genes* 13(11):1960. <https://doi.org/10.3390/genes13111960> [IF 4,141; SCOPUS, WoS; Scimago **Q2** – 2022 Genetics] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, скринінг геномів і біоінформатичний аналіз, написання рукопису та підготовка статті до друку).

7. Melnyk S, Stepanyshyn A, **Yushchuk O**, Mandler M, Ostash I, Koshla O, Fedorenko V, Kahne D, Ostash B (2022) Genetic approaches to improve clorobiocin production in *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504. *Applied microbiology and biotechnology* 106(4):1543–1556. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11814-4> [IF 5,560; SCOPUS, WoS; Scimago **Q1** – 2022 Applied Microbiology and Biotechnology] (Особистий внесок здобувача: участь в концептуалізації, розробка методики перенесення плазмід в NRRL 3504, аналіз продукції хлоробіоцину в рекомбінантних штамів, аналіз результатів ВЕРХ, написання рукопису та підготовка статті до друку).

8. Andreo-Vidal A, Binda E, Fedorenko V, Marinelli F, **Yushchuk O** (2021) Genomic insights into the distribution and phylogeny of glycopeptide resistance

determinants within the *Actinobacteria* phylum. *Antibiotics* (Basel, Switzerland) 10(12):1533. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121533> [IF 5,222; SCOPUS, WoS; Scimago Q2 – 2021 Infectious Diseases] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, скринінг геномів і біоінформатичний аналіз, написання рукопису та підготовка статті до друку).

9. Hrab P, Rückert C, Busche T, Ostash I, Kalinowski J, Fedorenko V, **Yushchuk O**, Ostash B (2021) Complete genome sequence of *Streptomyces cyanogenus* S136, producer of anticancer angucycline landomycin A. 3 *Biotech* 11(6):282. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02834-4> [IF 2,893; SCOPUS, WoS; Scimago Q2 – 2021 Biotechnology] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація і планування дослідження, верифікація результатів аналізу *in silico*, участь в підготовці рукопису до друку).

10. **Yushchuk O**, Vior NM, Andreo-Vidal A, Berini F, Rückert C, Busche T, Binda E, Kalinowski J, Truman AW, Marinelli F (2021) Genomic-led discovery of a novel glycopeptide antibiotic by *Nonomuraea coxensis* DSM 45129. *ACS Chemical Biology* 16(5):915–928. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00170> [IF 4,634; SCOPUS, WoS; Scimago Q1 – 2021 Biochemistry] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, аналіз *in silico*, характеристика кластера, виконання всіх генно-інженерних робіт, пошук оптимальних умов культивування DSM 45129 для продукції антибіотика, ферментація DSM 45129 і похідних, аналіз і інтерпретація даних ВЕРХ, написання рукопису та підготовка статті до друку).

11. **Yushchuk O**, Ostash I, Mösker E, Vlasiuk I, Deneka M, Rückert C, Busche T, Fedorenko V, Kalinowski J, Süßmuth RD, Ostash B (2021) Eliciting the silent lucensomycin biosynthetic pathway in *Streptomyces cyanogenus* S136 via manipulation of the global regulatory gene *adpA*. *Scientific reports* 11(1):3507. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82934-6> [IF 4,996; SCOPUS, WoS; Scimago Q1 – 2021 Multidisciplinary] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, аналіз *in silico*, характеристика кластера, виконання всіх генно-інженерних робіт і аналізу отриманих рекомбінантів, пошук оптимальних умов культивування для продукції люцензоміцину, написання рукопису та підготовка статті до друку).

12. **Yushchuk O**, Homoniuk V, Datsiuk Y, Ostash B, Marinelli F, Fedorenko V (2020) Development of a gene expression system for the uncommon actinomycete *Actinoplanes rectilineatus* NRRL B-16090. *Journal of applied genetics* 61(1):141–149. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00534-7> [IF 2,653; SCOPUS, WoS; Scimago Q2 – 2020 Genetics] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, виконання досліджень, написання рукопису та підготовка статті до друку).

13. **Yushchuk O**, Homoniuk V, Ostash B, Marinelli F, Fedorenko V (2020) Genetic insights into the mechanism of teicoplanin self-resistance in *Actinoplanes teichomyceticus*. *The Journal of antibiotics* 73(4):255–259. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0274-9> [IF 3,424; SCOPUS, WoS; Scimago

Q3 – 2020 Pharmacology] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, виконання досліджень, написання рукопису та підготовка статті до друку*).

14. **Yushchuk O**, Andreo-Vidal A, Marcone GL, Bibb M, Marinelli F, Binda E (2020) New molecular tools for regulation and improvement of A40926 glycopeptide antibiotic production in *Nonomuraea gerenzanensis* ATCC 39727 *Frontiers in microbiology* 11:8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00008> [IF 6,064; SCOPUS, WoS; Scimago **Q1** – 2020 Microbiology] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, виконання досліджень, написання рукопису та підготовка статті до друку*).

15. **Yushchuk O**, Binda E, Marinelli F (2020) Glycopeptide antibiotic resistance genes: distribution and function in the producer actinomycetes. *Frontiers in microbiology* 11:1173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01173> [IF 6,064; SCOPUS, WoS; Scimago **Q1** – 2020 Microbiology] (*Особистий внесок здобувача: аналіз літератури і написання розділів присвячених продуцентам глікопептидів, створення ілюстрацій, підготовка статті до друку*).

16. **Yushchuk O**, Ostash B, Truman AW, Marinelli F, Fedorenko V (2020) Teicoplanin biosynthesis: unraveling the interplay of structural, regulatory, and resistance genes. *Applied microbiology and biotechnology* 104(8):3279–3291. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10436-y> [IF 5,560; SCOPUS, WoS; Scimago **Q1** – 2020 Applied Microbiology and Biotechnology] (*Особистий внесок здобувача: аналіз літератури і написання огляду, створення ілюстрацій, підготовка статті до друку*).

17. Koshla O, **Yushchuk O**, Ostash I, Dacyuk Y, Myronovskiy M, Jäger G, Süssmuth RD, Luzhetskyy A, Byström A, Kirsebom LA, Ostash B (2019) Gene *miaA* for post-transcriptional modification of tRNA_{XXA} is important for morphological and metabolic differentiation in *Streptomyces*. *Molecular microbiology* 112(1):249–265. <https://doi.org/10.1111/mmi.14266> [IF 3,979; SCOPUS, WoS; Scimago **Q1** – 2019 Molecular biology] (*Особистий внесок здобувача: створення репортерної системи на основі плазмиди pSAGA, створення подвійного мутанта $\Delta miaA \Delta bldA$, створення плазмід із різними алелями гена *adrA*, комплементация мутантів $\Delta miaA$ і $\Delta miaA \Delta bldA$ різними алелями *adrA*, аналіз властивостей мутантів і рекомбінантів, участь в написанні рукопису і підготовці статті до друку*).

18. **Yushchuk O**, Kharel M, Ostash I, Ostash B (2019) Landomycin biosynthesis and its regulation in *Streptomyces*. *Applied microbiology and biotechnology* 103(4):1659–1665. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09601-1> [IF 5,560; SCOPUS, WoS; Scimago **Q1** – 2019 Applied Microbiology and Biotechnology] (*Особистий внесок здобувача: аналіз літератури і розділів огляду, присвячених організації кластерів генів біосинтезу і регуляції продукції ландоміцинів, створення ілюстрацій, підготовка статті до друку*).

19. **Yushchuk O**, Horbal L, Ostash B, Marinelli F, Wohlleben W, Stegmann E, Fedorenko V (2019) Regulation of teicoplanin biosynthesis: refining the roles of

tei cluster-situated regulatory genes. Applied microbiology and biotechnology 103(10):4089–4102. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09789-w> [IF 5,560; SCOPUS, WoS; Scimago **Q1** – 2019 Applied Microbiology and Biotechnology] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку).

20. **Yushchuk O**, Ostash I, Vlasiuk I, Gren T, Luzhetskyy A, Kalinowski J, Fedorenko V, Ostash B (2018) Heterologous AdpA transcription factors enhance landomycin production in *Streptomyces cyanogenus* S136 under a broad range of growth conditions. Applied microbiology and biotechnology 102(19):8419–8428. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9249-1> [IF 5,560; SCOPUS, WoS; Scimago **Q1** – 2018 Applied Microbiology and Biotechnology] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку).

21. Rabyk M, **Yushchuk O**, Rokytskyi I, Anisimova M, Ostash B (2018) Genomic insights into evolution of *adpA* family master regulators of morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces*. Journal of molecular evolution 86(3-4):204–215. <https://doi.org/10.1007/s00239-018-9834-z> [IF 3,973; SCOPUS, WoS; Scimago **Q2** – 2018 Genetics] (Особистий внесок здобувача: участь в аналізі даних, виконання експериментальної частини, участь в написанні рукопису та підготовці статті до друку).

22. Koshla O, Lopatniuk M, Rokytskyi I, **Yushchuk O**, Dacyuk Y, Fedorenko V, Luzhetskyy A, Ostash B (2017) Properties of *Streptomyces albus* J1074 mutant deficient in tRNA^{Leu}_{UAA} gene *bldA*. Archives of microbiology 199(8):1175–1183. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1389-7> [IF 2,667; SCOPUS, WoS; Scimago **Q3** – 2017 Genetics] (Особистий внесок здобувача: вивчення особливостей морфології і продукції антибіотиків в *ΔbldA* мутанта, участь в написанні рукопису та підготовці статті до друку).

23. **Юшук ОС**, Осташ БО, Горбаль ЛО, Федоренко ВО (2017). Реконструкція філогенії кластерів генів біосинтезу глікопептидів. Фактори експериментальної еволюції організмів 20:109-115. [фахове видання України] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, біоінформатичний аналіз, написання рукопису та підготовка статті до друку).

24. Tsypik O, **Yushchuk O**, Zaburannyi N, Flärdh K, Walker S, Fedorenko V, Ostash B (2016) Transcriptional regulators of GntR family in *Streptomyces coelicolor* A3(2): analysis *in silico* and *in vivo* of YtrA subfamily. Folia microbiologica 61(3):209–220. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0426-7> [IF 2,629; SCOPUS, WoS; Scimago **Q3** – 2016 Microbiology] (Особистий внесок здобувача: вивчення розповсюдження генів YtrA-регуляторів серед актинобактерій, аналіз властивостей генів SCO0823 і SCO3812, участь в написанні рукопису та підготовці статті до друку).

Патент:

1. Патент України на винахід №119472 Україна, МПК (2006.01)C12P 1/06

C12P 19/64 C12N 15/80 C12R 1/465 Спосіб активування продукції сполук з антибіотичною та протигрибною властивостями у *Streptomyces cyanogenus* S136 / **Юшук О.**, Осташ Б.; заявник і власник Львівський національний ун-т ім. І. Франка. – № а201702642, заявл. 21 березня 2017 р., опубл. 25.06.2019, Бюл. № 12. [патент України на винахід] (Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту).

Публікації, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Stepanyshyn A., **Yushchuk O.**, Marinelli F., Kalinowski J., Fedorenko V. Expression of pathway-specific regulators from dalbaheptide biosynthetic gene clusters induces antimicrobial properties of *Amycolatopsis bartoniae* DSM 45807. XVIII international scientific conference for students and PhD students dedicated to the 195th anniversary from the birthday of Julius Planer «Youth and progress of biology»: abstracts, Lviv, 6–7 September 2022. Львів: Сполом, 2022. Р. 72-73. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції).

2. Duban R., Stepanyshyn A., Melnyk S., Fedorenko V., Ostash B., **Yushchuk O.** Approaching the activation of salinamide-like biosynthetic gene cluster in clorobiocin producer *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504. IV International Scientific Conference: «Microbiology and Immunology – the Development»: book of abstracts, Kyiv, 22-23 September 2022. Kyiv: Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2022. Р. 65. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції).

3. Stepanyshyn A., Melnyk S., **Yushchuk O.**, Ostash I., Koshla O., Fedorenko V., Ostash B. Developing genetic instruments for manipulating *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504 genome for increasing clorobiocin production. IV International Scientific Conference: «Microbiology and Immunology – the Development»: book of abstracts, Kyiv, 22-23 September 2022. Kyiv: Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2022. Р. 81. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції).

4. Andreo-Vidal A., **Yushchuk O.**, Berini F., Binda E., Marinelli F. Novel glycopeptide antibiotic by *Nonomuraea coxensis* DSM 45129. Online congress ExpoBAC Zaragoza 2020: abstracts, Zaragoza, 8-9 July 2021. Zaragoza: Spain, 2021. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції).

5. Andreo-Vidal A., Binda E., Marinelli F., **Yushchuk O.** Comparative genomics of *van*-genes in glycopeptide producing *Actinobacteria* and beyond. VAAM Workshop 2021: Abstract book, Tübingen, 22-23 September 2021.

Tübingen: Germany, 2021. P. 49. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач здійснив онлайн-доповідь*).

6. Степанишин А., Мельник С., Остап Б., **Ющук О.** Аналіз мовчазного кластера генів біосинтезу криптичного салінамід-подібного антибіотика у продуцента хлоробіоцину *S. roseochromogenes*. XVII Міжнародна конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»: тези доповідей, Львів, 27–29 квітня 2021 р. Львів, 2021. С. 114-115. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції*).

7. **Yushchuk O.**, Ostash I., Melnyk S., Kalinowski J., Süssmuth R., Ostash B. Revealing cryptic secondary metabolome of *Streptomyces* via manipulation of global regulatory gene *adpA*. 3rd International conference on natural products discovery and development in the genomic era: abstracts, San Diego, 13 January 2020. <https://sim.confex.com/sim/np2020/meetingapp.cgi/Paper/40268>. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом*).

8. **Ющук О.**, Жукровська К.-О., Федоренко В. Сенсорний домен гістидинової кінази Tei3 не здатний реагувати на глікопептидні антибіотики. XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса: тези доповідей, Львів, 9-11 квітня 2019 р. Львів, 2019. С. 37. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції і зробив усну доповідь*).

9. **Ющук О.**, Власюк І., Остап І., Федоренко В., Остап Б. Властивості базальних представників ортологічної групи AdpA-регуляторів. XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса: тези доповідей, Львів, 9-11 квітня 2019 р. Львів, 2019. С. 36. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції*).

10. Homoniuk V., **Yushchuk O.**, Ostash B., Fedorenko V. Pathway-specific regulator of teicoplanin biosynthesis *tei15** does not interact with *tei2* promotor in heterologous system. XIV International scientific conference of students and PhD students «Youth and progress of biology»: abstracts, Lviv, 10-12 April 2018. Lviv, 2018. P. 128-129. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції і зробив усну доповідь*).

11. Vlasiuk I., **Yushchuk O.**, Ostash B., Fedorenko B. Landomycin A production of AdpA-overexpressing *S. cyanogenus* S136 strains in extremely depleted media. XIV International scientific conference of students and PhD

students «Youth and progress of biology»: abstracts, Lviv, 10-12 April 2018. Lviv, 2018. P. 132. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції*).

12. Vlasiuk I., Ostash B., **Yushchuk O.**, Ostash I., Kuzhyk Y., Melnyk S., Hrab P., Suessmuth R., Fedorenko V. Pleiotropic transcriptional factor AdpA as a tool to upregulate antibiotic production by *Streptomyces*. International Conference «Advances in microbiology and biotechnology»: abstract book, Lviv, 29-31 October 2018. Lviv, 2018. P. 44. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь частково засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом*).

13. Vlasiuk I., **Yushchuk O.** Heterologous AdpA activate cryptic lucensomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces cyanogenus* S136. XIII international scientific conference of young scientists «Biology: from molecule to biosphere»: abstracts, Kharkiv, 28-30 November 2018. Kharkiv, 2018. P. 82-83. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції*).

14. Жукровська К.-О., **Ющук О.**, Федоренко В. Дослідження індукцибельності сенсорної гістидинової кінази *Tei3* з *Actinoplanes teichomyceticus*. XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського: тези доповідей, Львів, 10-12 квітня 2018. Львів, 2018. С. 133. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції*).

15. Koshla O., **Yushchuk O.**, Ostash I., Kravets K., Suessmuth R., Jäger G., Bystrom A., Ostash B., Fedorenko V. Post-transcriptional modifications of tRNA modulate secondary metabolism of *Streptomyces*. International Conference “Advances in microbiology and biotechnology”: abstract book, Lviv, 29-31 October 2018. Lviv, 2018. P. 75. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь частково засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом*).

16. Vlasiuk I., **Yushchuk O.** Expression of different *adpA* genes increases landomycin A production in *Streptomyces cyanogenus* S136 // XII international scientific conference of young scientists «Biology: from molecule to biosphere»: abstracts, Kharkiv, 29 November – 1 December 2017. Kharkiv, 2017. P. 68. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції і зробив усну доповідь*).

17. Гомонюк В.В., **Ющук О.С.**, Горбаль Л.О. Експресія генів стійкості до глікопептидів у продуцента тейкопланіну *Actinoplanes teichomyceticus*. XII

Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери»: тези доповідей, Харків, 29 листопада – 1 грудня 2017 р. Харків, 2017. С. 64. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції*).

18. Zhukrovska K.-O., **Yushchuk O.** Expression of *tei3* gene encoding VanS-like sensor histidine kinase from teicoplanin biosynthesis gene cluster leads to teicoplanin resistance in *S. coelicolor* M512. XII international scientific conference of young scientists «Biology: from molecule to biosphere»: abstracts, Kharkiv, 29 November – 1 December 2017. Kharkiv, 2017. P. 69. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції*).

19. **Yushchuk O.** Evolution of glycopeptide and moenomycin antibiotic biosynthesis pathways in bacteria. International conference «Integrative Biology & Medicine»: abstracts, Kyiv, 2-7 October, 2017. Kyiv, 2017. P. 75. (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах здобувача, здобувач здійснив усну доповідь*).

Оцінка мови і стилю дисертації. Дисертація представлена роботами із коректним та адекватним використанням наукової термінології. Оформлення дисертації відповідає вимогам, що пред'являються до подібних робіт. Дисертація не містить секретних відомостей.

3. Дисертаційна робота **Ющука Олександра Сергійовича «Генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків»**, відповідає паспорту спеціальності 03.00.22 – молекулярна генетика за такими напрямками досліджень:

- Збереження генетичної інформації: тонка структура генів, еволюція генетичних систем клітин і вірусів.
- Передача генетичної інформації: біосинтез ДНК, механізми та закономірності передачі генетичної інформації від клітини до клітини, від покоління до покоління.
- Реалізація генетичної інформації: експресія генів, що проявляються в конкретних ознаках і властивостях клітин, вірусів.

- Змінювання генетичної інформації: молекулярна природа та механізми мутацій, рекомбінацій, кросинговеру та репарацій.

- Розроблення нових методів і біотехнологій для практичного використання.

4. Дисертаційна робота **Ющука Олександра Сергійовича «Генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків»**, виконана за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика, є завершеною науковою працею, яка має теоретичне та практичне значення. Результати досліджень в повній мірі висвітлені в роботах автора. Дисертаційна робота відповідає вимогам пунктів 7–9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 року та МОН України щодо докторських дисертацій.

Результати дослідження дозволяють вирішувати проблеми створення антибіотиків нового покоління та вивчення механізмів генетичної детермінації їхнього синтезу. За допомогою методів молекулярної генетики, геноміки і біоінформатики встановлено взаємозв'язки між організацією і експресією структурних генів, генів плейотропних і шлях-специфічних регуляторів, та біосинтезом антибіотиків. На підставі філогеномного аналізу геномів бактерій встановлено закономірності поширення і еволюції генів стійкості до глікопептидних антибіотиків. Розроблено підходи до активації мовчазного вторинного метаболізму актиноміцетів із використанням генів плейотропних регуляторів. Оптимізовано методи перенесення плазмідної ДНК і надекспресії генів у актиноміцетів-продуцентів пептидних і полікетидних антибіотиків. Отримано надпродуцентів клінічно-важливого антибіотика А40926, перспективного протиракового антибіотика ландоміцину А і відкрито новий глікопептидний антибіотик.

Дисертація відповідає принципам академічної доброчесності, містить обґрунтовані висновки на основі одержаних особисто здобувачем достовірних результатів, характеризується єдністю змісту.

5. Рекомендувати дисертаційну роботу кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника Львівського національного університету імені Івана Франка **Ющука Олександра Сергійовича на тему «Генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків»** до захисту у спеціалізованій вченій раді з присудження наукового ступеня доктора наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

31 березня 2023 р.

Рецензенти:

Заступник директора з наукової роботи ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», доктор біологічних наук

 Сергій ШУЛЬГА

Завідувач відділом популяційної генетики ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», доктор біологічних наук

 Ярослав ПІРКО

Завідувач відділом рослинних харчових продуктів та біофортificaції ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», доктор біологічних наук

 Станіслав ІСАЄНКОВ

Власноручні підписи Сергія Шульги, Ярослава Пірка та Станіслава Ісаєнкова підтверджую.

Вчений секретар
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», доктор біологічних наук



 Ярослав ПІРКО