

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Лю Вэньсюэ «Исследование молекулярных свойств D-аминокислотной оксидазы», представленной на соискание ученой степени кандидат биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

Актуальность

Оксидазы D-аминокислот имеют важное биотехнологическое значение, поскольку применяются для промышленного получения цефалоспоринов и используются для создания биосенсоров D-аминокислот, которые нужны для контроля качества пищевых продуктов. Кроме того, эти ферменты могут использоваться в медицине, например, для антираковой терапии. Свойства ферментов этой группы, например, стабильность и субстратная специфичность, у разных организмов могут различаться и лучше или хуже подходить для решения конкретных биотехнологических задач. Поэтому задача по выявлению новых оксидаз D-аминокислот и получению их характеристик является очень актуальной. У дрожжей *Ogataea parapolymorpha* было выявлено четыре гена, кодирующих белки, гомологичные известным оксидазам D-аминокислот. Продукты трех из них были получены путем экспрессии в клетках *Escherichia coli*, что позволило продемонстрировать их активность и субстратную специфичность. В задачи данной работы входило определить, как эти гены регулируются и как инактивация этих генов сказывается на способности *O. parapolymorpha* утилизировать D-аминокислоты. Для эффективного использования этих ферментов важно понимание их структуры и механизмов осуществляемого ими катализа. Исследование этих аспектов также вошло в диссертационную работу.

Основные результаты, полученные в работе

В представленном диссертационном исследовании были сконструированы кассеты для инактивации генов *O. parapolymorpha* HP2082, HP2165, HP2914 и HP2400, кодирующих оксидазы D-аминокислот. С помощью этих кассет были получены мутанты с инактивацией этих генов по отдельности (HP2165-Δ, HP2914-Δ и HP2400-Δ), двойные мутанты (HP2165-Δ HP2082-Δ, HP2400-Δ HP2082-Δ и HP2400-Δ HP2914-Δ) и тройной мутант HP2082-Δ HP2400-Δ HP2914-Δ. Получены данные об оксидазной активности в

клетках мутантов, индуцируемой при выращивании в присутствии D-аланина. Показано, что в отсутствие гена *HP2165* сильно снижается активность при окислении D-фенилаланина, а в отсутствие *HP2400* – при окислении D-аспартата. Эти результаты хорошо согласовывались с данными исследователей кафедры химической энзимологии МГУ о субстратной специфичности этих ферментов, полученных путем гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli*. Методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени были определены относительные уровни индукции генов *HP2082*, *HP2165*, *HP2914* при выращивании дрожжей на разных источниках углерода и азота.

Был апробирован новый подход с использованием наночастиц серебра для усиления сигнала комбинационного рассеяния. Этот подход был использован для анализа изменения структуры флавина в составе молекулы оксидазы D-аминокислот.

Научная новизна и практическая ценность работы

В ходе диссертационного исследования получена панель штаммов *O. parapolyomorpha* с различными комбинациями нарушений генов, кодирующих оксидазы D-аминокислот. Анализ способности этих штаммов расти на средах с различными источниками углерода и азота позволил выявить физиологическую роль оксидаз D-аминокислот, кодируемых генами *HP2165* и *HP2400*. Получены важные данные об изменениях структуры флавина в составе молекулы оксидазы D-аминокислот, происходящих в ходе катализа.

Структура диссертационной работы

Работа построена по традиционному плану. В разделе «Введение» обоснована актуальность работы, кратко описаны предпосылки этого исследования и сформулированы задачи. В «Обзоре литературы» описано современное состояние областей научного знания, имеющих непосредственное отношение к тематике и методологии диссертационной работы. В разделе «Материалы и методы» описаны использованные в работе методики, а также штаммы и плазмиды. Результаты исследования изложены и обсуждены в соответствующих разделах. Работа изложена на 170 страницах, содержит 56 рисунков, 10 таблиц и список литературы, включающий 201 источник.

Основные замечания и вопросы

Замечания к работе в основном касаются некоторых недостатков в изложении материала.

1. Есть некоторая путаница в использовании названий микроорганизмов. В частности, иногда используется старые названия, например *Pichia* и *Hansenula*, иногда новые – *Komagataella*, а иногда, как на странице 34, все вместе как будто это разные организмы. Лучше было бы использовать только новые названия и использованный в работе модельный организм называть *Ogataea parapolyomorpha* DL-1. Использование старого названия приводит к дополнительной путанице, поскольку на странице 35 автор пишет о неспособности штамма DL-1 к скрещиванию с другими штаммами *H. polymorpha* при том, что это на самом деле разные виды, *O. parapolyomorpha* и *O. polymorpha*. Видовое название не может начинаться с заглавной буквы (*H. Polymorpha*).

2. В обзоре литературы также на стр. 34 автор утверждает, что галактоза, лактоза, мелибиоза и рамноза – это полисахариды. С этим утверждением трудно согласиться.

3. Также на стр. 34 утверждается, что эволюционная близость видов рода *Hansenula* подтверждена сходством содержания G-C в ДНК и электрофоретической подвижности алькогольоксидаз. Как говорилось выше, это родовое название устарело, а в современном мире родство гораздо точнее можно устанавливать по сходству последовательностей генов. Автору нужно было найти более свежие источники о классификации метилотрофных дрожжей.

4. По-видимому, из-за неудачного перевода с русского на английский были использованы некоторые неудачные термины. Например, рестриктаза названа «restrictionase», а не «restriction enzyme», чашка Петри названа «cup», а не «Petri dish» а твердые среды правильно называть «solid», а не «dense». Также «formate dehydrogenase», а не «format dehydrogenase».

5. Методика определения активности оксидаз D-аминокислот описана дважды – на страницах 70 и 72.

6. Для метанола, глицерина и глюкозы используются обозначения Met, Gly и Glu. Это очень неудобно для чтения, поскольку они совпадают с принятыми сокращениями для аминокислот: метионина, глицина и глутамата.

7. На стр. 98 на основании данных о скорости роста колоний на разных средах делаются заключения об индукции тех или иных генов. Это некорректно. Об индукции экспрессии генов можно косвенно судить по изменению активности в разных мутантах или прямо – по данным ПЦР в реальном времени. Но эти данные приведены в следующих разделах.

8. Подписи к рисункам 23 и 25 непонятны. На рисунке 24 отсутствует столбец D-Asp у d2082-2400 и столбец D-Ala d2165-2082. Это означает, что нет данных или нет активности? Это стоило пояснить.

Кроме того, при чтении диссертации возник ряд вопросов:

1. В разделе Материалы и методы описывается получение очищенного фермента DAAO1 *O. parapolyomorpha* путем экспрессии кодирующего его гена в клетках *E. coli*. В этом разделе использовано обозначение OpaDAAO. В разделе Результаты и обсуждение при описании результатов ИК-спектроскопии, по-видимому для того же белка используется название HpDAAO. Однако первая часть работы посвящена изучению четырех генов *O. parapolyomorpha*, кодирующих оксидазы D-аминокислот. Продукт какого конкретно из них был использован для ИК-спектроскопии и почему был выбран именно он?

2. На рисунке 21, где приведен анализ влияния нарушений генов DAAO на скорость роста колоний на различных средах, видно, что двойные мутанты, у которых есть нарушение гена 2082, растут на среде с DL-аланином лучше, чем другие штаммы. Можно было бы решить, что это вследствие нарушения гена 2082, однако данных для мутанта с нарушением только этого гена не приведено. Были ли такие данные и как можно объяснить этот эффект? Действительно ли ген 2082 может как-то мешать утилизировать DL-аланин?

3. В данных, описанных на стр. 99, удивительно то, что штамм дикого типа, штаммы с делециями 2165, 2400 и тройной мутант 2165-2914-2400 росли на среде «метанол-глицерин-D-Ala» лучше, чем на среде с глюкозой и стандартным источником азота. Обычно на среде с глюкозой штаммы *O. parapolymorpha* достигает до более высокой плотности, чем на среде с такой смесью метанола и глицерина. Означает ли это, что D-аланин используется как источник и азота и углерода? Сколько D-аланина было в среде? Достаточно ли этого количества для объяснения разницы в плотности культуры. Вместо соотношения плотностей культуры на рисунке 22 стоило привести значения плотностей на двух средах, то есть исходные данные. Удивительно также и то, что только штамм с делецией 2914 рос лучше на среде с глюкозой и стандартным источником углерода. Если бы дело было в том, что продукт этого гена важен для утилизации D-аланина, то и тройной мутант отставал бы в росте на среде «метанол-глицерин-D-Ala». Есть ли другие объяснения этому эффекту? На Рис 22. стоило указать в подписи, что обозначение d3 соответствует тройному мутанту и перечислить названия делеционных аллелей. На этой диаграмме не отображены погрешности. Сколько раз проводили эксперимент? Можно ли считать эти данные достоверными? Этот же вопрос может быть адресован к диаграммам на рис. 23-25.

4. На стр. 101 автор ссылается на данные о субстратной специфичности оксидаз HP2165, HP2914 и HP2400, полученные на кафедре химической энзимологии. Есть ли данные о специфичности продукта четвертого гена, HP2082?

5. Какой ген использовали для сравнения в экспериментах по анализу количества РНК методом RT-PCR? Почему не был взят в этот анализ ген HP2400?

Высказанные замечания не являются критическими и не снижают общей высокой оценки работы.

Заключение.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации Лю Вэньсюэ «Исследование молекулярных свойств D-аминокислотной оксидазы» соответствует специальности **1.5.2 – Биофизика** (по биологическим наукам).

а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель **Людмила Вячеславовна** заслуживает присуждения ученой степени кандидат биологических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник

ФИЦ Биотехнологии РАН,

доктор биологических наук



Михаил Олегович Агафонов

Контактные данные:

Ленинский проспект д. 33 стр. 2, Москва 119071, Россия

эл. почта agaphonov@inbi.ras.ru

тел.: +7 (495) 954-40-97

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 1.5.4. Биохимия