

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию Лю Вэньсюэ на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
на тему: «Исследование молекулярных свойств D-аминокислотной
оксидазы»
по специальности 1.5.2. – «Биофизика»**

Актуальность темы исследования. Диссертационная работа Лю Вэньсюэ посвящена изучению свойств оксидаз D-аминокислот из штамма метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* DL1, кодируемых четырьмя разными генами. Оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3) является FAD-содержащим ферментом, катализирующим стереоспецифическое окислительное дезаминирование D-аминокислот. В результате реакции образуются пероксид водорода и иминокислота, которая неферментативно гидролизует до α -кетокислоты и иона аммония.

Оксидазы D-аминокислот находят широкое применение. Наиболее важным является получение 7-аминоцефалоспоровой кислоты, из которой затем получают цефалоспориновые антибиотики, а также продукция 4-метилтио-2-оксобутановой кислоты (индуктора апоптоза), которая применяется как противораковый агент. Кроме того, они используются в тонком органическом синтезе, синтезе неприродных L-аминокислот. Они вовлечены в патогенез таких нейродегенеративных заболеваний как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и (по последним данным шизофрении). По этой причине существует заинтересованность в исследовании фермента с целью возможного создания сенсора D-аминокислот, для чего необходимы исследования характерных свойств фермента. Таким образом, **цель диссертационного работы Лю Вэньсюэ, в котором исследована оксидаза D-аминокислот из малоизученного источника (штамм метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* DL1) для получения более производительного штамма, а также изучены основные биофизические характеристики фермента с помощью набора биофизических методов (комбинационного рассеяния, ИК-спектроскопии и флуоресценции**

однофотонного счета), актуальна как с точки зрения теоретической, так и прикладной науки.

Структура диссертационной работы. Диссертация написана по классическому образцу и содержит следующие разделы: «Введение», где дана общая характеристика работы, «Обзор литературы»; «Материалы и методы», в котором подробно изложены все использованные диссертантом методы исследования; «Результаты и обсуждение». Во «Введении» описана актуальность исследуемой проблемы, цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, а также новизна работы. Диссертация завершается «Заключением», где кратко описаны все результаты, и «Выводами». Общий объем диссертации 170 страниц, она содержит 56 рисунков, 10 таблиц, в списке цитируемой литературы 201 источник.

Раздел «**Материалы и методы**» описаны методы, использованные для получения экспериментальных данных. Надо отметить, что все они подробно описаны и могут быть легко воспроизведены. В процессе работы Лю Вэньсюэ освоила большое количество сложнейших современных методов исследования, среди которых биофизические (Рамановская спектроскопия, инфракрасная спектроскопия, пикосекундная флуоресцентная спектроскопия, динамическое светорассеяние для определения размеров белка), биохимические (выделение тотальной РНК, получение очищенных ферментов и определение ферментативной активности), микробиологические (работа с культурами микроорганизмов) и методы молекулярной биологии (генетический нокаут, создание генно-инженерных конструкций, ПЦР в реальном времени) и химических (синтез серебряных наноструктур). Все это в совокупности с полученными экспериментальными результатами демонстрирует высокую квалификацию диссертанта.

В первой части «**Обзора литературы**» диссертационной работы Лю Вэньсюэ рассмотрены структура и основные свойства D-оксидазы аминокислот: трехмерная организация, спектральные характеристики и константы связывания флавинового кофермента (FAD), стабильность фермента при изменении pH, субстратная специфичность, а также сходство и

различия D-оксидаз аминокислот из разных источников по этим параметрам. Подробно описан механизм катализа и основные особенности активного центра, обеспечивающие широкую субстратную, но ограниченную стереоспецифичность D-оксидазы аминокислот.

Автор приводит данные о пероксисомной локализации оксидазы D-аминокислот в клетках грибов и индукции ее активности под действием различных агентов, включая D-аминокислоты (в частности D-аланин, особенно если он является единственным источником углерода и азота), глюкозу, сукцинат. Подробно рассмотрены подходы к продукции D-оксидазы аминокислот и гибридных молекул, включающих дополнительные белковые последовательности для очистки фермента, полученного в рекомбинантных системах, как в прокариотических (*E. coli*), так и в эукариотах (дрожжи) с использованием различных промоторов. Отдельно описано применение фермента в области биотехнологии с особым вниманием к генетическим особенностям, обмену веществ и использованию различных генно-инженерных подходов для метилотрофных дрожжей (среди них и род *Hansenula*), которые в качестве источника углерода могут использовать метанол. И, наконец, рассмотрена система Cre-loxP, используемая для нокаута генов в клетках *Hansenula polymorpha*, которая была применена диссертантом для нокаута генов HP_2082, HP_2165 и HP_2400 в настоящей работе.

Во второй части «Обзора литературы» рассмотрены основы физических методов, использованных диссертантом в настоящей работе для исследования изменений конформации D-оксидазы аминокислот. Это метод комбинационного рассеяния (Рамановская спектроскопия) и его модификация – гигантское комбинационное рассеяние, позволяющая исследовать изменения конформации белков в живой клетке, а также метод инфракрасной спектроскопии и пикосекундной флуоресцентной спектроскопии (метод однофотонного счета). Последний представляет собой крайне чувствительный метод, позволяющий обнаруживать следовые количества вещества.

«Результаты и обсуждение». На начальном этапе работы диссертантом было проведено сравнение аминокислотной последовательности оксидаз, кодируемых четырьмя генами *H. polymorpha*, и выявлено, что гомология белков составляет от 44 до 50%. В процессе работы были созданы конструкции для нокаута D-оксидаз, кодируемых генами HP2082, HP2165, HP2400, и проведена инактивация отдельных генов. Это позволило изучить влияние нокаутов на активность каждой из D-оксидаз аминокислот, кодируемых разными генами, а также определить производительность мутантных клеток при различных условиях культивирования, что в свою очередь позволило выявить субстратную специфичность оксидаз, кодируемых генами HP2914 (оксидаза специфична по отношению к D-Ala), HP2165 (оксидаза, специфичная по отношению к D-Phe) и HP2400 (оксидаза, специфичная по отношению к D-Asp и D-Glu). Установлено также, что D-аланин в сочетании с 1% глицерином и 1% метанолом индуцируют экспрессию генов HP2165 и HP2914.

Во второй части раздела «Результаты и обсуждение» диссертационной работы Лю Вэньсюэ описаны исследования спектральных свойств отдельных белковых молекул с целью разработки методических подходов для регистрации конформационных переходов в молекулах D-оксидаз аминокислот. Для регистрации конформационных переходов в молекулах использовали методы комбинационного рассеяния (Рамановская спектроскопия), ИК-спектроскопия, флуоресценции однофотонного счета. На этом этапе на отдельных белковых молекулах была разработана методика регистрации спектров комбинационного рассеяния (включая гигантское комбинационное рассеяние) и ИК-спектроскопии, которую впоследствии планируется использовать для изучения оксидаз D-аминокислот.

Диссертантом были получены Рамановские спектры для различных концентраций β -каротина и продемонстрирована способность серебряных наноструктур значительно усиливать Рамановский сигнал каротиноида. Более того, было обнаружено, что возможно зарегистрировать Рамановский сигнал каротиноида в плазме крови, разведенной в 10 и 100 раз. При

нанесении молекулы каротиноида на серебряные наноструктуры чувствительность метода возрастала в 10^4 раз, что позволяет регистрировать каротин в плазме больных.

Далее автором были проведены эксперименты, позволяющие разработать методику регистрации конформационных изменений D-оксидазы аминокислот с использованием оптических методов: была определена зависимость спектров поглощения и флуоресценции фикоцианина от величины pH. Полученные данные свидетельствуют, что при повышении pH наблюдается сдвиг поглощения спектра хромофора в длинноволновую область, а спектра флуоресценции – в коротковолновую. На заключительном этапе были исследованы изменения структуры флавина в процессе активации D-оксидазы аминокислот с использованием методом гигантского светорассеяния, а также с помощью ИК-спектроскопии и пикосекундной флуоресценции (метод однофотонного счета).

Обнаружено, что регистрация КР-спектров D-оксидазы аминокислот без усиления сигнала с помощью серебряных наноструктур невозможна. Спектры, зарегистрированные с использованием серебряных плазмонных наноструктур, выявили характерные максимумы, соответствующие колебаниям связей в одном из трех ароматических колец FAD. В ходе окислительно-восстановительной реакции при образовании комплекса флавина с субстратом обнаружено изменение конформации флавина: смещение максимума 1252 см^{-1} в длинноволновую область, что диссертант объясняет изменением ориентации аминокислоты в активном центре фермента.

Полученные результаты показывают, что предложенный в работе подход, основанный на комбинационной спектроскопии с использованием серебряных плазмонных наноструктур, может быть применен в исследованиях механизма реакции различных изоформ D-оксидаз.

Методом однофотонного счета при активации оксидазы D-аминокислот обнаружены изменения амплитуды флуоресценции триптофана, которые происходят с разной скоростью в ферментах из разных источников, что автор

объясняет локальными изменениями их конформации. Таким образом, в результате проведенного исследования были разработаны методические подходы, позволяющие с использованием различных спектральных методов регистрировать конформационные изменения молекул оксидаз D-аминокислот в ходе прохождения реакции.

В заключении можно сделать вывод, что диссертационная работа Лю Вэньсюэ представляет собой интересное и хорошо выполненное исследование, свидетельствующее о высокой квалификации автора. Невзирая на высокую оценку этой работы к автору есть ряд вопросов и замечаний.

Вопросы и замечания

1. Активность D-оксидаз в мутантных клетках дрожжей проводилась после пермеабилизации клеток. К сожалению, в работе не указано, каким образом увеличивали проницаемость клеточных мембран. Далее клетки инкубировали в течение достаточно длительного времени (30 мин) при температуре 40° С. Была ли активность фермента постоянной в течение всего этого периода?

2. На рисунке 34, где представлен спектр флуоресценции фикоцианина, изменения в максимумах флуоресценции при закислении среды pH выглядят не очень значительными. Каким образом были определены (рассчитаны) максимумы флуоресценции и каковы их значения при pH 5,0; 7,0 и 9,0?

В работе встречаются некоторые неточности и опечатки. В частности, сокращенное написание «Классификация ферментов» (по-русски КФ) на английском языке пишется как EC (Enzyme Classification).

В заключении необходимо отметить, что диссертационная работа Лю Вэньсюэ соответствует специальности 1.5.2. «Биофизика», а именно следующим ее направлениям: биофизика клетки. Указанные выше замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации 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 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, а соискатель Лю Вэньсюэ заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. «Биофизика».

Официальный оппонент:

профессор, доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник группы кафедры
биохимии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Лопина Ольга Дмитриевна

20 марта 2025 года

Контактные данные: тел.: 7(495)939-44-34, e-mail: (

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 03.01.04 – Биохимия

Адрес места работы: Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова
биологический факультет, кафедра биохимии.