

ОТЗЫВ
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу
Лю Вэньсюэ

"Исследование молекулярных свойств D-аминокислотной оксидазы",
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.2. биофизика (биологические науки)

Актуальность темы. В представленной многоплановой работе проводились актуальные исследования важного фермента, D-аминокислотной оксидазы (DAAO), в том числе его структурных особенностей и реакционной способности для потенциальных будущих применений в сенсорике, биотехнологиях и медицине, с использованием метилотрофного штамма дрожжей *H. polymorpha* DL-1.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов. В целом, представленные результаты и выводы из работы являются прямым следствием экспериментальных усилий автора и не содержат ложной информации. В работе активно использовано современное аналитическое оборудование, что повышает достоверность полученных автором диссертации данных. В ходе проведения работ был получен ряд обоснованных результатов, которые имеют элементы новизны, что было отражено в научных положениях диссертации, выносимых на защиту.

Научная новизна. В результате выполнения работы предложен вектор для генетической инактивации гена DAAO, получена коллекция нокаутных генов DAAO/DDO и проведена их комплексная характеристика, подтверждена субстратная специфичность оксидаз *H. polymorpha*, установлено, что использование наноструктур серебра позволяет получить усиленный сигнал комбинационного рассеяния, что может быть использовано для генерации предположений об изменении структуры в ходе биохимической реакции.

Практическая значимость. Полученные в диссертационной работе данные потенциально могут позволить сформулировать новые подходы в экспресс - диагностике заболевания (таких, как шизофрения, болезни Альцгеймера и Паркинсона).

Краткая характеристика основного содержания диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Полный объем диссертации составляет 170 страниц, содержит 56 рисунков, 10 таблиц и 201 источник литературы. Ссылки содержат, в основном, актуальную информацию, таблицы, схемы и рисунки, в основном, подготовлены качественно и позволяют лучше понять текстовое изложение и идеи автора, хотя в ряде случаев к ним имеются замечания. Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, представлены положения, выносимые на защиту. В разделе "Обзор литературы" представлено описание структурных и функциональных особенностей DAAO, проведен анализ особенностей структуры DAAO из различных природных источников, а также обсуждены подходы по использованию методов оптической спектроскопии. В главе "Материалы и методы"

описаны объекты ("DAAO из *Hansenula polymorpha*", "DAAO из почки свиньи") и методы исследования, порядок приготовления препаратов и обработки полученных данных. В разделе результаты и их обсуждение описаны создание и конструирование DAAO для дрожжей *Hansenula polymorpha*, получение и характеристика трансформантов с нокаутом гена HP2400, культивирование нокаутных штаммов в жидких и плотных средах YNB с различными источниками азота, проведено исследование потребности в азоте и углероде для индукции оксидазной активности фермента, дан анализ конформации кофактора-FAD при инкубации DAAO с D-аланином и D-серином, а также конформационных изменений белка при активации DAAO и изменений параметров пикосекундной флуоресценции триптофана белка при активации DAAO. В разделе заключения дан взгляд на основные достижения диссертационной работы и затем приведены выводы и список литературы.

Цель, поставленная в работе, и сопутствующие ей задачи в основном выполнены, что следует из пространного обсуждения полученных результатов. На современном уровне, с привлечением необходимых методов анализа выполнен большой объем экспериментальной работы и проведена интерпретация полученных результатов. Достоинством работы является ее междисциплинарный характер. Выводы соответствуют полученным в работе результатам, хотя и сформулированы в несколько лаконичной и непривычной форме. Содержание автореферата вполне соответствует материалам диссертации. Таким образом, диссертация представляет собой, в целом, завершенное, самодостаточное, структурировано изложенное исследование. Тем не менее, к работе имеется ряд замечаний и вопросов:

1. Что в диссертации понимается под молекулярными свойствами основного объекта исследований DAAO? В химии молекулярные свойства – это параметры связей и конформации, однако участие в реакциях относится к реакционной способности соединения, но не к ее молекулярным свойствам.
2. Каким образом подтверждалась истинность / оригинальность штамма дрожжей, который был выбран для исследований, и не было ли при культивировании каких – либо мутаций? Чем объясняется влияние различных источников азота и углерода на рост штаммов дрожжей? Почему были выбраны именно такие источники, а не какие – то иные? Для чего проводилась оптимизация состава питательных сред? Нельзя ли было использовать стандартные, сертифицированные среды?
3. Что понимается в работе под термином «методика»? Набор технических приемов получения спектра или также процедура интерпретации полученных данных, которые в случае SERS могут быть отнесены в случае сложных биополимерных молекул к суперпозиции колебательных мод простейших функциональных групп в определенной конфигурации, зависящей, помимо всего прочего, от особенностей хемосорбции аналита на SERS – подложке. Насколько полученные результаты действительно относятся к интактной структуре молекулы? Не изменяла ли сама подложка структуру DAAO и не изменяли ли буферные растворы, использованные в методике SERS, свойства самой подложки?

4. «Вероятно, положение максимума 1252 см^{-1} SERS-спектра может быть использовано в качестве индикатора для оценки взаимодействия белков.» Что конкретно имеется в виду?
5. Зачем на подложки из коллоидного серебра наносился каротин? Какое отношение раздел 3.2.2. про каротин имеет отношение к основной теме работы?
6. Ряд утверждений в работе выглядят наукообразно, но не имеет четкого и понятного смысла, по крайней мере, для рецензента - химика. Например, «SERS-спектр восстановленной формы флавина (FAD) характеризуется меньшим числом максимумов по сравнению с окисленной формой, что связано, вероятно, с изменением делокализации π -электронных орбиталей на атомах N(5) и N(10) (Nishina et al., 1986)» Можно пояснить этот тезис? «Активация обоих типов DAAO приводит к снижению амплитуды флуоресценции триптофана, которое, вероятно, обусловлено повышением эффективности миграции энергии от триптофана, возможно, за счет уменьшения расстояния между донором и акцептором, вызванного сжатием молекулы фермента.» Можно пояснить данное утверждение? Какой энергии? По какому механизму миграции? Как это связано с конформацией?
7. Какова абсолютная интенсивность сигнала на приведенных в работе спектрах SERS? Если автор использовал нормировку, то на какую величину или величину чего? Практически ни на каких рисунках это не указано, просто убрана ось интенсивности, что не является общепринятым стандартом отображения ГКР спектров. Автор использует аббревиатуры SERS и GRS. В чем разница?
8. Подложки с наноструктурированным серебром были получены USSR методом (А.А.Семенова и др.). С какой воспроизводимостью получали сигнал SERS с разных участков данной «кольчужной» подложки? Как вычиталась базовая линия в спектрах и что такое intramolecular reference" (стр.109 диссертации)?
9. Текст диссертации и автореферата можно было бы дополнительно оптимизировать. Сокращения и обозначения обычно дают в начале диссертации, но в автореферате наличие нерасшифрованных обозначений очень затрудняет понимание текста. Разделы 1.17, 1.19 в диссертации выглядят лишними, поскольку носят общий, учебно – методический характер. Табл. 1 на стр. 55 диссертации содержит абсолютно лишние технические данные, достойные лишь примечаний. Рис. 29 диссертации не читаем. Текст диссертации содержит неверные гиперссылки и ошибки форматирования, текст автореферата содержит орфографические, грамматические и стилистические неточности. Рисунок 51 дублируется, соответственно, в диссертации произошел сбой нумерации рисунков. В автореферате отсутствует описание личного вклада соискателя и раздел с благодарностями. И в автореферате, и в диссертации многие числовые данные приведены небрежно, с крайне избыточным количеством значащих цифр, многие рисунки содержат такие цифры (с избыточной точностью отображения), которые непонятно, к чему относятся. К сожалению, последнее – очень популярное замечание почти ко всем современным диссертационным работам. С точки зрения обработки данных, автору стоило бы с большей аккуратностью подходить к

деконволюции спектров и интерпретации получаемых спектральных компонент.

Перечисленные замечания носят, по большей части, частный характер и не снижают общего положительного впечатления от диссертации.

Общее заключение. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским работам. Общий объем, структура, количество публикаций и апробация на конференциях удовлетворяют установленным нормам. Личный вклад автора подтвержден участием во всех этапах исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.2. биофизика (биологические науки), 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 Лю Вэньсюэ заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. биофизика (биологические науки).

Официальный оппонент
Заведующий кафедрой наноматериалов,
зам. декана факультета наук о материалах
Московского государственного университета
Имени М.В.Ломоносова,
Доктор химических наук,
член-корреспондент РАН

Гудилин Е.А.

Контактные данные:

тел.: +79

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

02.00.21 – Химия твердого тела

Адрес места работы:

119991, Россия, Москва, Ленинские Горы, д. 1, стр. 73 (лабораторный корпус Б), факультет наук о материалах, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, заведующий кафедрой наноматериалов,

Подпись зав. кафедрой
Зав. кафедрой Гудилин
Евгений Александрович