

Отзыв научного руководителя

на диссертацию Лю Вэньсюэ по теме «Исследование молекулярных свойств D-аминокислотной оксидазы» по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки)

В клетках организма человека D-аминокислотная оксидаза (DAAO) участвуют в синтезе нейромедиаторов, а изменения активности DAAO и концентрации D-АА сопровождается патогенез ряда заболеваний (шизофрения, болезни Альцгеймера и Паркинсона). У низших эукариот ферменту отводится важная функция: клетки грибов и дрожжей используют D-АА в качестве источника углерода и азота. Ферменты DAAO, из разных источников, характеризуются различной чувствительностью к pH, температуре, а также величиной K_M и удельной активностью фермента по отношению к различным субстратам. Вариативность типов и свойств DAAO определяет разнообразие их практического применения. Биосенсоры, разработанные на основе их активности и молекулярных свойств, могут быть использованы в новых методах диагностики и контроля бактериального загрязнения продуктов питания; биокатализаторы на основе DAAO широко распространены в промышленности для конверсии модифицированных D-аминокислот при синтезе антибиотиков; их высокая стереоспецифичность может быть использована для получения α -кетокислот, природных и не природных L-аминокислот, важных для синтеза лекарств. В связи с высоким биотехнологическим и медицинским значением DAAO интерес представляет разработка эффективных и рентабельных систем для их биотехнологического получения.

Целью работы Лю Вэньсюэ было исследование физиологическую роль ферментов DAAO у дрожжей *H. polymorpha* DL1, кодируемых разными генами и физико-химические свойства белка при активации фермента. В ходе проведения научно-исследовательской работы по теме диссертации Лю Вэньсюэ разработала ряд оригинальных методов генетической инактивации генов оксидаз D-аминокислот у дрожжей *H. Polymorpha*, получила нокауты генов DAAO/DDO и провела их генетическую и биофизическую характеристику.

Автором получен набор мутантных штаммов *H. polymorpha* DL-1 с нарушением генов, кодирующих DAAO. Разработанный подход инактивации гена оксидазы D-аминокислот в дрожжах *H. Polymorpha* использован для получения нокаутных генов DAAO, их генетической и физиологической характеристики, а также для подтверждения субстратной специфичности оксидазы *H. polymorpha* и изучения конформации белков и флавинов *in vitro*. Использование подложки из коллоидных наночастиц серебра позволяет увеличить чувствительность КР в 10^5 - 10^6 (регистрация сигнала при 10^{-9} моль/л белка) и исследовать изменения конформации флавина DAAO. При взаимодействии флавина DAAO с

субстратом происходит изменение его конформации, сопровождающееся смещением максимума SERS-спектра 1252 см^{-1} в длинноволновую область, что, вероятно, связано с изменением координации активного центра фермента по отношению к молекуле аминокислоты. При взаимодействии DAAO с D-аланином изменения конформации флавина происходят в течение более короткого промежутка времени, чем при взаимодействии с D-серином, что объясняет механизм субстратной специфичности DAAO. С помощью ИК-спектроскопии и метода однофотонного счета выявлены изменения конформации белка (флуоресценция триптофана, вклад полос амида 1 и амида 2) при активации обоих типов DAAO, что свидетельствует о конформационных переходах не только во флавине, но и в молекуле белка. Результаты работы изложены в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности.

В связи с этим считаем, что диссертационная работа, Лю Вэньсюэ может быть рекомендована к защите в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2 Биофизика (биологические науки).

Научный руководитель
доктор биологических наук, профессор, академик РАН
Андрей Борисович Рубин
/А. Б. Рубин/
4.09.2024