

Заключение диссертационного совета МГУ.015.5
по диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук
Решение диссертационного совета от «17» апреля 2025 г. № 6

О присуждении Лю Вэньсюэ, гражданину КНР, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Исследование молекулярных свойств D-аминокислотной оксидазы» по специальности 1.5.2. Биофизика принята к защите диссертационным советом 19 декабря 2024 г., протокол №7.

Соискатель – Лю Вэньсюэ, 1994 года рождения, в 2023 соискатель окончила аспирантуру биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (направленность: биоинженерия, научная специальность: биомеханика и биоинженерия). В период подготовки диссертации Лю Вэньсюэ обучалась как в очной аспирантуре биологического МГУ имени М. В. Ломоносова, так и по программе подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре на английском языке, реализуемой в сетевой форме совместно с университетом МГУ-ППИ в Шэньчжэне (КНР).

В настоящее время соискатель работает в медицинском университете г. Гуанчжоу (КНР).

Диссертация выполнена на кафедре биофизики биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор Максимов Георгий Владимирович, кафедра биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор

доктор биологических наук, профессор, академик РАН Рубин Андрей Борисович, кафедра биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, заведующий кафедрой

Официальные оппоненты:

Лопина Ольга Дмитриевна, доктор биологических наук, профессор, кафедра биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник

Гудилин Евгений Алексеевич, доктор химических наук, профессор, член-корр. РАН, кафедра наноматериалов факультета наук о материалах МГУ имени М. В. Ломоносова, заведующий кафедрой

Агафонов Михаил Олегович, доктор биологических наук, группа геномного редактирования промышленных микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы Биотехнологии РАН», ведущий научный сотрудник, руководитель группы

дали положительные отзывы на диссертацию.

Выбор официальных оппонентов обосновывался их высоким уровнем компетентности в области биофизики и наличием соответствующих публикаций в ведущих российских и международных журналах.

Соискатель имеет 4 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации 4 работы, из них 4 статьи, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (в скобках приведен импакт-фактор журнала IF; индекс цитируемости SJR; объём публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах):

1. **Liu W.**, Eldarov M.A., Shutova V.V., Maximov G.V. Genetic inactivation of D-amino acid oxidase genes in methylotrophic yeast *Hansenula Polymorpha* // Herald of the Bauman Moscow State Technical University, Series Natural Sciences. — 2021. — Vol. 99, No. 6. — P. 110–120. DOI: 10.18698/1812-3368-2021-6-110-120 (**SJR 0.258, 0.732/ 0.345 п.л.**)
2. **Liu W.**, Shutova V.V., Maksimov G.V., Hao J., He Y. Use of nanostructured silver substrates (coatings) to study the content and conformation of β -carotene // Herald of the Bauman Moscow State Technical University, Series Natural Sciences. – 2022. – Vol. 101, No. 2. – P. 112-124. DOI: <https://doi.org/10.18698/1812-3368-2022-2-112-124> (**SJR 0.258, 0.879/ 0.163 п.л.**)
3. Bochkova J.V., **Liu W.**, Brazhe N.A., Zhgun A.A., Maksimov G.V. A Raman Spectroscopic Study of the Conformation of Flavin Adenine Dinucleotide, a CoEnzyme of D-Amino Acid Oxidase // Biophysics. – 2023. – Vol. 68. – P. 719-724. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006350923050068> (**SJR 0.251, 0.769/ 0.321 п.л.**)
4. Parshina E.Yu, **Liu W.**, Yusipovich A.I., Gvozdev D.A., He Y., Pirutin S.K., Klimanova E.A., Maksimov E.G., Maksimov G.V. Spectral and conformational characteristics of phycocyanin associated with changes of medium pH // Photosynthesis Research. – 2024. – Vol. 161, No. 1-2. – P. 93-103. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11120-023-01068-0> (**SJR 0.856, 0.563 / 0.247 п.л.**)

На автореферат диссертации поступило 4 дополнительных отзыва, все положительные.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для биофизики, а именно:

1. Получена коллекция нокаутов генов оксидазы D-аминокислот в полиморфных дрожжах

Hansenula polymorpha, включающие один одинарный нокаут, три двойные и один тройной нокаут. В системе *in vitro* подтверждена субстратная специфичность оксидаз *H. polymorpha* DL-1 с использованием нокаутных штаммов.

2. Установлено, что D-аланин в сочетании с 1% глицерина и 1% метанола способен индуцировать активность всех трех основных оксидаз D-аминокислот *H. polymorpha*. Напротив, глюкоза, и L-аланин подавляют активность оксидазы. Показано, что D-аланин в сочетании с 1% глицерина и 1% метанола индуцирует экспрессию генов HP2165 и HP2914.

3. Доказано, что использование наноструктурированной подложки из серебра позволяет увеличить чувствительность КР в 10^5 - 10^6 (регистрация сигнала при концентрации белка 10^{-9} моль/л), что использовалось для исследования конформации флавина оксидазы D-аминокислот.

4. Установлено, что в ходе окислительно-восстановительной реакции флавина и субстрата происходит изменение конформации флавина (смещение максимума КР-спектра 1252 см^{-1} в длинноволновую область), что, вероятно, связано с ориентацией молекулы аминокислоты в активном центре оксидазы D-аминокислот. Изменения в активном центре оксидазы D-аминокислот при взаимодействии с D-аланином происходят быстрее, чем при действии D-серина, что, вероятно, является причиной различной субстратной специфичности фермента.

5. С помощью ИК -спектроскопии выявлено изменение вклада полос амида 1 и амида 2 при активации обоих типов оксидаз D-аминокислот, что свидетельствует о конформационных переходах как во флаване, так и в молекуле белка. Методом однофотонного счета обнаружены изменения амплитуды флуоресценции триптофана при активации оксидазы D-аминокислот, которые протекают быстрее в рkDAAO, чем в НpDAAO и, вероятно, связаны с локальными изменениями конформации молекулы белка.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством.

Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

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 позволило 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.

На заседании 17 апреля 2025 года диссертационный совет принял решение присудить Лю Вэньсюэ ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 10 докторов наук по специальности 1.5.2. «Биофизика», участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 16, против 0, недействительных бюллетеней 1.

Заместитель председателя диссертационного совета,
доктор физико-математических наук, профессор

Лобышев Валентин Иванович

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат физико-математического наук

Фурсова Полина Викторовна

17.04.2025