

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук
Лю Вэньсюэ «Исследование молекулярных свойств D-аминокислотной оксидазы» по
специальности 1.5.2. Биопизика (биологические науки)

Актуальность темы исследования. Диссертационная работа Лю Вэньсюэ посвящена исследованию молекулярных механизмов действия фермента, D-аминокислотной оксидазы (DAAO), который представляет собой FAD-содержащий флавопротеин, катализирующий стереоспецифическое окислительное дезаминирование D-аминокислот (D-AA) до альфа-кетокислот и аммиака. Ко-субстратом является кислород, который в ходе реакции превращается в перекись водорода. DAAO выполняют важные функции в клетках и находят широкое практическое применение в биотехнологии. В клетках организма человека DAAO участвуют в синтезе нейромедиаторов, а изменения активности DAAO и концентрации D-AA сопровождается патогенез ряда заболеваний (шизофрения, болезни Альцгеймера и Паркинсона). У низших эукариот ферменту отводится важная функция: клетки грибов и дрожжей используют D-AA 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.

В связи с этим исследование, проведенное Лю Вэньсюэ, цель которого сформулирована как исследование физиологической роли ферментов DAAO у дрожжей *H. polymorpha* DL1, кодируемых разными генами и физико-химические свойства белка при активации фермента, является, безусловно, актуальным, а полученные диссертантом данные имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

В ходе проведенного исследования Лю Вэньсюэ был 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*. Отмечу, что автором впервые было доказано, что при взаимодействии флавина DAAO с субстратом происходит изменение его конформации, связанное с изменением

координации активного центра фермента по отношению к молекуле аминокислоты. Важно, что 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 современных методов, ИК-спектроскопии и метода однофотонного счета Лю Вэньсюэ были выявлены изменения конформации при активации обоих типов DAAO, что свидетельствует о конформационных переходах не только во флавине, но и в молекуле белка.

В заключении отмечу, что диссертационная работа Лю Вэньсюэ соответствует специальности 1.5.2. «Биофизика», а именно следующим ее направлениям: биофизика клетки. Вместе с тем, указанные 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.

Таким образом, соискатель Лю Вэньсюэ заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. «Биофизика».

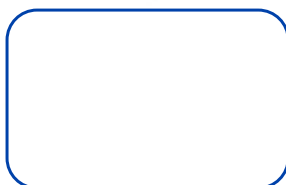
Берестовская Юлия Юрьевна,
Кандидат биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология, научный
сотрудник лаборатории реликтовых микробных сообществ.
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного
учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук».

Адрес: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2.

Сайт: <http://fbras.ru>

Тел: 8(499)135-21-39

«18» марта 2025 г.



(подпись)

Подпись Берестовской Ю.Ю. заверяю
Доктор биологических наук
Заместитель Ученого секретаря ФИЦ
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Мысякина Ирина Сергеевна



(подпись)

REVIEW

on the abstract of the dissertation for the degree of candidate of biological sciences Liu Wenxue "Study of the molecular properties of D-amino acid oxidase" in the specialty 1.5.2. Biophysics (biological sciences)

Relevance of the research topic. Liu Wenxue's dissertation is devoted to the study of the molecular mechanisms of action of the enzyme, D-amino acid oxidase (DAAO), which is a FAD-containing flavoprotein that catalyzes the stereospecific oxidative deamination of D-amino acids (D-AA) to alpha-keto acids and ammonia. The co-substrate is oxygen, which is converted into hydrogen peroxide during the reaction. DAAO perform important functions in cells and are widely used in biotechnology. In human cells, DAAO participates in the synthesis of neurotransmitters, and changes in DAAO activity and D-AA concentration accompany the pathogenesis of a number of diseases (schizophrenia, Alzheimer's and Parkinson's diseases). In lower eukaryotes, the enzyme has an important function: fungal and yeast cells use D-AA as a source of carbon and nitrogen. DAAO enzymes from different sources are characterized by different sensitivity to pH, temperature, as well as the KM value and specific activity of the enzyme in relation to various substrates. In this regard, the study conducted by Liu Wenxue, the purpose of which is formulated as a study of the physiological role of DAAO enzymes in *H. polymorpha* DL1 yeast encoded by different genes and the physicochemical properties of the protein during enzyme activation, is certainly relevant, and the data obtained by the dissertation candidate are of both fundamental and applied importance. In the course of the study, Liu Wenxue obtained a set of mutant strains of *H. polymorpha* DL-1 with a disruption of the genes encoding DAAO. The developed approach to inactivation of the D-amino acid oxidase gene in *H. Polymorpha* yeast was used to obtain knockout DAAO genes, their genetic and physiological characteristics, as well as to confirm the substrate specificity of *H. polymorpha* oxidase and study the conformation of proteins and flavins in vitro.

It should be noted that the author was the first to prove that when flavin DAAO interacts with a substrate, its conformation changes associated with a change in the coordination of the enzyme's active center in relation to the amino acid molecule. It is important that when DAAO interacts with D-alanine, changes in the conformation of flavin occur over a shorter period of time than when interacting with D-serine, which explains the mechanism of DAAO substrate specificity. Using modern methods, IR spectroscopy and the single-photon counting method, Liu Wenxue revealed conformational changes upon activation of both types of DAAO, indicating conformational transitions not only in flavin, but also in the protein molecule.

In conclusion, I would like to note that Liu Wenxue's dissertation work corresponds to specialty 1.5.2. "Biophysics", namely to the following areas: cell biophysics. At the same time, these

remarks do not diminish the significance of the dissertation research. The dissertation meets the requirements established by the Lomonosov Moscow State University for works of this kind. The content of the dissertation corresponds to specialty 1.5.2. "Biophysics" (in biological sciences), as well as to the criteria defined in paragraphs. 2.1-2.5 of the Regulations on Awarding Academic Degrees at Lomonosov Moscow State University, and is also drawn up in accordance with the requirements of the Regulations on the Council for the Defense of Dissertations for the Degree of Candidate of Sciences at Lomonosov Moscow State University.

Thus, applicant Liu Wenxue deserves to be awarded the academic degree of Candidate of Biological Sciences in specialty 1.5.2. "Biophysics".

Yulia Yuryevna Berestovskaya,
Candidate of Biological Sciences in specialty 1.5.11 - Microbiology, research associate at the
Laboratory of Relict Microbial Communities.

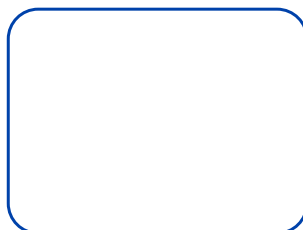
S.N. Vinogradsky Institute of Microbiology of the Federal State Institution "Federal Research
Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences".

Address: 119071, Moscow, Leninsky Prospekt, 33, building 2.

Website: <http://fbras.ru>

Tel: 8(499)135-21-39

«18» марта 2025 г.



(подпись)

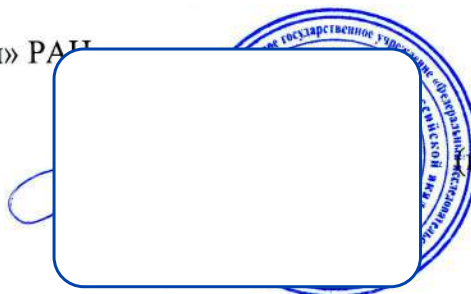
Подпись Берестовской Ю.Ю. заверяю

Доктор биологических наук

Заместитель Ученого секретаря ФИЦ

«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Мысякина Ирина Сергеевна



(подпись)