

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Булыгина Анатолия Алексеевича
«Анализ молекулярного механизма субстратной специфичности
апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы и рациональный дизайн фермента с
измененными свойствами»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.4 – биохимия

Апуриновые/апиримидиновые (АП) эндонуклеазы семейства APE1 играют ключевую роль в эксцизионной репарации оснований (ЭРО), обеспечивая гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от АП-сайта. Однако их способность узнавать и гидролизовать ряд модифицированных нуклеотидов в рамках иницизионной репарации (ИРН) остается недостаточно изученной на молекулярном уровне. Диссертационная работа Булыгина А.А. направлена на выяснение механизмов выворачивания и узнавания поврежденных нуклеотидов АП-эндонуклеазами, подобными APE1 человека, чем обусловлена актуальность и научная новизна исследования. На основе полученных данных были созданы АП-эндонуклеазы с измененной субстратной специфичностью, что определяет практическую значимость работы.

Булыгиным А.А. впервые проведен комплексный анализ молекулярных механизмов узнавания поврежденных нуклеотидов APE1-подобными эндонуклеазами человека, *Danio rerio*, *Xenopus laevis* и *Drosophila melanogaster* с использованием методов молекулярной динамики (МД). Автором установлено, что ключевым элементом, определяющим специфичность, является конформационная подвижность петли Asn229–Thr233, смещение которой происходит за счет разрыва водородных связей внутри белка, что позволяет активному центру адаптироваться к объемным повреждениям. Также было проведено моделирование полных траекторий выворачивания поврежденных нуклеотидов (DHU, dU, αA, εA) в активный центр, что позволило выявить роль петли Val172–Arg177 на ранних этапах распознавания субстрата.

Особый интерес представляет практическая значимость исследования: на основе полученных данных автором рационально сконструированы мутантные формы zAPE1 (Asn229Gly, Ala230Gly, Glu236Ala) с измененной субстратной специфичностью. С использованием методов стационарной и предстационарной кинетики, а также микроскопического термофореза, показано, что замена Glu236Ala значительно повышает эффективность гидролиза «сложных» ИРН-субстратов, содержащих dU, αA и εA, что открывает возможности для создания ферментов с заданными каталитическими свойствами.

К тексту автореферата имеется несколько замечаний.

- Автору следовало бы пояснить, почему представляет интерес исследовать взаимодействие APE1-подобных эндонуклеаз с ДНК-дуплексами, содержащими 1,N⁶-этенoadенозин и 9-альфа-аденозин. В отличие от 2'-дезоксиуридина это неприродные нуклеозиды в составе ДНК.
- В разделе, посвященном моделированию траекторий выворачивания нуклеотидов (стр. 6), отсутствует информация об условиях проведения молекулярно-динамических расчетов. Например, параметры модели растворителя и концентрации ионов металлов могут существенно влиять на стабильность ДНК-белкового комплекса, поэтому включение этих деталей позволило бы более полно оценить воспроизводимость и физиологическую релевантность полученных траекторий.
- В разделе, посвященном кинетическому моделированию данных остановленного потока (табл. 7), анализ приведен только для мутантных форм, тогда как данные для фермента дикого типа отсутствуют. Это не позволяет оценить степень изменения кинетических параметров при введении аминокислотных замен. Тем не менее, даже тут видны изменения между Asn229Gly,

Ala230Gly и Glu236Ala. В тексте следовало бы пояснить причины отсутствия данных для дикого типа фермента.

- На рис. 13 Б и 16 указаны, вероятно, ошибочно другие номера мутантных форм zAPE1, чем в тексте автореферата.

Автореферат написан грамотно, хорошо иллюстрирован. Для удобства восприятия результатов можно было бы рекомендовать автору систематизировать данные молекулярной динамики для разных ферментов и субстратов в виде таблицы. Также была бы полезной таблица, где были бы приведены ожидаемые ферментативные свойства для zAPE1 и её мутантных форм и реально полученные данные по гидролизу и связыванию модельный субстратов.

Указанные замечания не снижают общей высокой оценки работы. Полученные результаты достоверны, выводы обоснованы. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, что подтверждает высокий научный уровень работы, ее актуальность и значимость.

Диссертационная работа Булыгина А.А. «Анализ молекулярного механизма субстратной специфичности апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы и рациональный дизайн фермента с измененными свойствами» представляет собой законченное научное исследование и полностью соответствует требованиям п.п. 2.1-2.5 «Положения о присуждении учёных степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», предъявляемых к кандидатским диссертациям, а её автор, Булыгин Анатолий Алексеевич, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - биохимия.

Главный научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот
Научно-исследовательского института физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
доктор химических наук по специальности 02.00.10 - Биоорганическая химия,
профессор

Кубарева Елена Александровна

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 40

Телефон: +7(495)939-54-11

Электронная почта: kubareva@belozersky.msu.ru

Подпись Кубаревой Е.А. удостоверяю

Зав. канцелярией НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова

«25» марта 2026 г.



Н.Н. Сидорова