

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

о Булыгине Анатолие Алексеевиче, представившего диссертацию «Анализ молекулярного механизма субстратной специфичности апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы и рациональный дизайн фермента с измененными свойствами» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4-биохимия

Булыгин Анатолий Алексеевич работает в Лаборатории исследования модификации биополимеров Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН в течение четырех лет с 2019 г. по 2023 г. в качестве аспиранта при выполнении аспирантского плана исследований на кафедре молекулярной биологии и биотехнологии Факультета естественных наук НГУ. С 2023 г. по настоящее время Булыгин А.А. работает в Лаборатории генетических технологий ИХБФМ СО РАН в должности младшего научного сотрудника.

Диссертационная работа Булыгина А.А. посвящена выяснению механизмов выворачивания и распознавания повреждённых нуклеотидов апуриновыми/апиримидиновыми (АП) эндонуклеазами, подобными APE1 человека, методами предстационарной кинетики и компьютерного моделирования и созданию на основе АП-эндонуклеазы фермента с изменённой субстратной специфичностью.

Известно, что АП-эндонуклеазы являются многофункциональными ферментами. Считается, что их основная каталитическая функция – это гидролиз ДНК, содержащей АП-сайт. Кроме того, они обладают 3'-5' экзонуклеазной и рибонуклеазной активностью, а также способны гидролизовать фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от некоторых поврежденных нуклеотидов. Необходимо отметить, что структура АП-сайта, основного субстрата, и поврежденных нуклеотидов значительно отличается, а при осуществлении 3'-5' экзонуклеазной и рибонуклеазной активности фермент узнает и гидролизует фосфодиэфирные связи в неповрежденных нуклеиновых кислотах, полностью состоящих из природных нуклеотидов. АП-эндонуклеазы и их широкая и уникальная субстратная специфичность вызывают большой интерес у исследователей структур биополимеров. В частности, до сих пор остаётся без ответа вопрос о механизмах узнавания конкретных нуклеотидов, выступающих в качестве субстратов, активным центром APE1. На данный момент не известно, на каком этапе происходит отсев «неподходящих» повреждений и на чем основан механизм субстратной специфичности данных ферментов. Ответы на озвученные вопросы помогут не только лучше понять работу систем репарации, но и дадут возможность расширить область биотехнологического применения АП-

эндонуклеаз, например, как ферментов, гидролизующих цепь ДНК в определённом месте, что используется в сфере генной инженерии. Однако, исследование данных вопросов осложняется невозможностью получить стандартными методами кристаллографии комплексы белок-ДНК при использовании в качестве субстратов ДНК-дуплекс, содержащий нуклеотиды с поврежденными азотистыми основаниями, например такими как 2'-дезоксидигидроуридин (DHU), альфа-аномер аденозина (α A), 1,N6-этноаденозин (ϵ A) и 2'-дезоксисуридин (dU).

В совокупности, эти особенности делают эти ферменты интересным и актуальным объектом изучения как для биотехнологических целей, так и с точки зрения энзимологии. Понимание механизма функционирования APE1 и модификация субстратной специфичности помогут как разобраться в необычных свойствах фермента, так и позволят получить на его основе варианты, обладающие новыми, уникальными свойствами.

В связи с этим в рамках данной работы с применением методов молекулярной динамики, мутационного и кинетического анализа было выполнено исследование, направленное на выяснение механизма работы АП-эндонуклеаз, включающее определение принципиальных этапов субстратной специфичности ферментов данного класса и создание ряда мутантных форм zAPE1 *D. rerio*, обладающих изменённой субстратной специфичностью. Таким образом, диссертационная работа Булыгина А.А. представляет собой актуальную, но сложную и трудоёмкую задачу.

Для достижения поставленных в работе теоретических и экспериментальных задач Булыгиным А.А. был освоен широкий набор современных методов исследования белков и нуклеиновых кислот, включая как методы молекулярной биологии, биохимии, генетической инженерии, ферментативной кинетики так и современные методы молекулярного моделирования. Результаты, полученные Булыгиным А.А., позволили заключить, что важным фактором субстратной специфичности APE1-подобных АП-эндонуклеаз является конформационная жёсткость белковой петли, содержащей аминокислотные остатки с 229-го по 233-ий. Расширение кармана АЦ достигается конформационными перестройками «распознающей» петли 229-233, сопровождающимися разрывом нескольких внутрибелковых водородных связей. Причём, чем больше азотистое основание повреждённого нуклеотида, тем сильнее отклонение от конфигурации, подобной комплексу с АП-сайтом. Для проверки высказанных предположений были получены мутантные формы zAPE1, содержащие замены Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala, и определены их ферментативные свойства. Установлено, что замены аминокислотных остатков Ala230Gly и Glu236Ala снижают эффективность АП-эндонуклеазной активности фермента zAPE1 в 2-10 раз в зависимости от соотношения

концентраций с субстратом, но увеличивают активность на ИРН-субстратах. Установлено, что замена Ala230Gly увеличивает активность по отношению к dU-субстрату не менее, чем в 5 раз, а замена Glu236Ala приводит к увеличению активности по отношению к dU-, α A- и ϵ A- субстратам не менее, чем в 40, 10 и 50 раз, соответственно.

Булыгиным А.А. проведен большой объем теоретической и экспериментальной работы, который лег в основу патента, ноу-хау, 3 научно-популярных статей в журнале Наука из первых рук и 10 публикаций в российских и зарубежных научных журналах, индексируемых в базах WOS, из которых 4 публикации по теме диссертационной работы. Результаты его работ представлены на российских и международных конференциях.

Выводы работы корректны и полностью обоснованы полученным экспериментальным материалом. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. В целом работа Булыгина А.А. своевременна и актуальна, выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровне. По своей научной новизне, практической ценности и завершенности работа Булыгина А.А., несомненно, отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а соискатель заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия.

Научный руководитель
Зав. лабораторией генетических технологий
ИХБФМ СО РАН
д.х.н., чл.-корр. РАН

Кузнецов Н. А.

«02» марта 2026 г.

Подпись _____



Подпись Н.А. Кузнецова заверяю.
Учёный секретарь ИХБФМ СО РАН
к.б.н.



Логашенко Е.Б.