

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

**БУЛЫГИНА АНАТОЛИЯ АЛЕКСЕЕВИЧА**

**«Анализ молекулярного механизма субстратной специфичности**

**апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы и рациональный дизайн фермента с изменёнными свойствами»,**

представленную к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

Диссертационная работа Булыгина Анатолия Алексеевича посвящена изучению механизмов работы АП-эндонуклеаз, подобных эндонуклеазе АРЕ1 человека с использованием методов молекулярного моделирования и экспериментальных подходов.

Актуальность исследования обусловлена тем, что в клетках постоянно возникает большое число окислительных повреждений ДНК. Для предотвращения мутагенного и цитотоксического эффекта образующихся в ДНК модификаций необходимо как можно скорее удалять повреждения из генома, для чего существует несколько защитных репарационных систем. Эксцизионная репарация оснований отвечает за репарацию большей части модифицированных необъёмных азотистых оснований и АП-сайтов в ДНК. При этом АП-эндонуклеазы играют в этом процессе ключевую роль. Изучение молекулярных механизмов узнавания повреждений АП-эксзонуклеазами создаёт фундаментальный базис для понимания функционирования систем репарации ДНК, а с другой стороны может послужить основой для разработки терапевтических препаратов.

В ходе выполнения работы решались три основные задачи:

- 1) для выявления аминокислотных остатков, взаимодействующих с повреждённым основанием, и определения их роли в механизме субстратной специфичности провести моделирование методом молекулярной динамики (МД) структур комплексов АРЕ1 человека и АРЕ1-подобных АП-эндонуклеаз *Danio rerio*, *Xenopus laevis* и *Drosophila melanogaster* с ДНК-субстратами, содержащими повреждённые нуклеотиды: 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофуран (F-сайт), 2'-дезоксидигидроуридин (DHU), альфа-аномер аденозина ( $\alpha$ A), 1,N6-этноаденозин ( $\epsilon$ A) и 2'-дезоксисуридин (dU);
- 2) для определения аминокислотных остатков, взаимодействующих с азотистым основанием повреждённого нуклеотида по пути его выворачивания из ДНК-дуплекса в активный центр и потенциально ответственных за субстратную специфичность фермента,

исследовать методом МД выворачивание повреждённых нуклеотидов в активный центр АП-эндонуклеазы zAPE1 из *Danio rerio*;

3) на основании данных компьютерного моделирования создать ряд мутантных форм фермента zAPE1 с изменённой субстратной специфичностью и проверить экспериментально активность полученных мутантных форм методами стационарной и предстационарной кинетики для определения степени влияния введённых замен на АП-эндонуклеазную и ИРН-активности.

Научная новизна диссертации заключается в детальном изучении АП-эндонуклеаз zAPE1 из *Danio rerio*, xAPE1 из *Xenopus laevis* и Rrp1 из *Drosophila melanogaster*, подобных hAPE1 человека, с ДНК-субстратами, содержащими различные типы повреждений методами молекулярного моделирования и анализа, а также исследование влияния ряда ранее не изучавшихся мутаций на механизмы работы АП-эндонуклеазы zAPE1.

Диссертация написана очень хорошим грамотным языком, имеет традиционную структуру, состоит из разделов “Введение”, “Список сокращений”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты и их обсуждение”, “Заключение”, “Выводы” и “Список литературы”, которые изложены на 141 странице, работа проиллюстрирована 56 рисунками, содержит 2 схемы, 15 таблиц и 250 библиографических источников.

Наиболее важными результатами работы являются выявленная важность аминокислотных замен в петле Asn229 по Thr233 для субстратной специфичности АРЕ1-подобных АП-эндонуклеаз человека и определены молекулярные причины этого, показанное на примере фермента zAPE1 из *Danio rerio* влияние петли Val172-Arg177 и остатка Glu236 на выворачивание поврежденного нуклеотида, а также экспериментально подтвержденное влияние замен Ala230Gly и Glu236Ala на его субстратную специфичность.

Заключение и выводы полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования. Основные положения, выносимые на защиту, полностью выполнены автором представляют из себя новые научно значимые результаты и данные, полученные и проанализированные автором самостоятельно.

В процессе ознакомления с диссертацией возник ряд вопросов и замечаний, которые приведены ниже.

- 1) В разделе “Материалы и методы” не описано, каким образом автор рассчитывал концентрацию модифицированных олигонуклеотидов.
- 2) На странице 61 раздела “Материалы и методы” указано “Далее ДНК выделяли и проводили проверку полученных экспрессионных векторов путём секвенирования последовательности включённого гена.”. Однако информация о том кто проводил секвенирование и каким методом не приведена.
- 3) На странице 65 А.А. Булыгин пишет: “Эндонуклеаза хАРЕ1, имея 66%-ое сходство с hАРЕ1, несёт в себе только три потенциально важные замены...”. Что выступало критерием потенциальной важности замен не приведено.
- 4) На рисунках 17 и 18 показаны фрагменты траекторий длиной 115 нс и 120 нс по одной для каждой из исследованных структуры. Почему приведены разные длины траекторий? В материалах и методах указано, что моделирование проводили три раза для каждой структуры. Сохранялись ли закономерности в остальных двух траекториях для каждой из структур?
- 5) На рисунке 28 имеются обозначения 1 и 2, но в подписи к рисунку не подписано, что они обозначают.
- 6) На странице 80 в предложении “На рисунках 31, 32 показана динамика изменения расстояний (между ....” отсутствует закрывающая скобка.

Данные редкие замечания, ошибки и недочеты не снижают общей ценности диссертационной работы А.А. Булыгина и не влияют на ее общую положительную оценку.

Диссертационная работа А. А. Булыгина представляет собой завершённое, самостоятельное исследование, выполненное на современном научно-методологическом уровне. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в научных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus и представлены на двух конференциях.

Диссертационная работа Булыгина Анатолия Алексеевича по актуальности темы, объёму, научной новизне, теоретической и практической значимости отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН для диссертаций, представленных на соискание учёной степени кандидата наук. Диссертационная работа Булыгина Анатолия Алексеевича полностью соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор

диссертации, Булыгин Анатолий Алексеевич, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент:

Ломзов Александр Анатольевич,  
заведующий лабораторией структурной биологии  
ФГБУН Институт химической биологии и  
фундаментальной медицины СО РАН,  
к.ф.-м.н.



630090, г. Новосибирск,  
пр. Ак. Лаврентьева, д. 8  
телефон: 8 (383) 363-51-51  
e-mail: lomzov@1bio.ru

подпись к.ф.-м.н. Ломзова А.А. заверяю

Учёный секретарь: Логашенко Е.Б.

телефон: 8 (383) 363-51-55

e-mail: secretary@1bio.ru

дата отзыва: «02» апреля 2026 г.

