

## 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

Актуальность темы исследования не вызывает сомнений, поскольку выяснение особенностей функционирования столь важного и интересного фермента как апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза имеет фундаментальное значение. Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза является представителем большой группы весьма сложных ферментов, катализирующих превращения нуклеиновых кислот, которым нужно не просто осуществить каталитический акт, но еще и узнать, а часто трансформировать участок нуклеиновой кислоты, подвергающийся воздействию. Не менее важно и актуально данное исследование с практической точки зрения, поскольку апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза может быть использована в различных биотехнологических процессах, и, следовательно, получить фермент с измененными в нужном направлении свойствами может быть весьма полезно. Стоит также отметить, что сочетание в данной работе виртуальных методов с выделением фермента и оценкой его каталитических свойств позволяет оценить эффективность использованных биоинформатических подходов.

Диссертационная работа Булыгина А.А. состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 141 странице и хорошо иллюстрирована 56 рисунками, 2 схемами и 15 таблицами. Библиография включает 250 литературных источников из англоязычных изданий.

Введение написано четко, что позволяет сразу войти в суть представленной работы.

Обзор литературы весьма обширен и содержит много полезной информации по теме диссертации. В нем затронуты как основные методы моделирования, использованные в работе, так и свойства апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы и других ферментов, принимающих участие в процессах репарации. Однако, на мой взгляд, объем обзора, занимающий почти половину текста диссертации, излишен. Можно было бы избежать рассказа о ферментах в начале обзора, не описывать множество разных

ферментов, участвующих в репарации нуклеиновых кислот, ограничившись подробным описанием только апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы. При этом какие-то аспекты следовало бы описать более подробно. Так, авторы вообще не упоминают об использовании Альфа фолда разных поколений для моделирования взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами, хотя такие работы есть. Следовало бы в каком-то разделе диссертации хотя бы указать по каким причинам такой подход не использовался. Кроме того, можно было бы подробнее осветить особенности терминологии, связанные F-сайтом, который называют еще и F-субстратом, методы, использованные для оценки белок-белковых взаимодействий (стр. 45) и влияние разных белков на свойства апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы (стр. 45). Так, термин «флуоресцентные подходы» слишком общий, для того чтобы можно было судить о правильности вывода о существовании физических взаимодействий между белками. При описании влияния белков на свойства апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы следовало бы указать на конкретный механизм действия шаперона Hsp70 и пояснить, почему автор считает пероксиредоксин 1 шапероном.

Раздел материалы и методы исследования написан хорошо и подробно, что позволяет сделать вывод о достоверности полученных результатов и возможности их воспроизведения.

Раздел результаты и их обсуждение производит очень хорошее впечатление, он и написан отлично, и сделанные наблюдения вносят существенный вклад в понимание механизма функционирования такого сложного фермента как апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза. В работе прекрасно сочетаются методы моделирования и экспериментальная проверка полученных результатов на выделенных мутантных формах фермента. Как уже отмечалось выше, было бы интересно проверить полученные результаты с использованием Альфа фолда, однако и без его применения автору удалось сделать важные выводы о механизмах распознавания поврежденных участков нуклеиновых кислоты и роли конформационных изменений в осуществлении разных стадий каталитического акта. Проведенные исследования позволили автору найти такие аминокислотные остатки апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы, замена которых могла бы существенно изменить функциональные свойства фермента.

На основании полученных с помощью молекулярного моделирования данных автором были получены мутантные формы апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы, содержащие замены в петле Asn229-Thr233, имеющей определяющее значение в функционировании фермента, а также замену Glu236Ala. Автором проведена большая работа по изучению каталитических характеристик полученных мутантов в сравнении с

ферментом дикого типа. Следует особо отметить, что методы, с помощью которых оценивали каталитические функции фермента, трудоемки и требуют от экспериментатора высокой квалификации. Автору удалось получить в достаточном количестве три мутантные формы Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala фермента zAPE1 из *D. rerio* с высокой степенью очистки. Сравнение их каталитических параметров со свойствами фермента дикого типа, проведенные в том числе методом остановленного потока, показало сохранение кинетического механизма взаимодействия фермента с ДНК, содержащей F-сайт. При этом замены Ala230Gly и Glu236Ala изменяли субстратную специфичность, что было доказано при использовании разных типов субстратов. Таким образом, эксперименты с мутантными формами апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазы позволили подтвердить сделанные на основании молекулярного моделирования предположения, а также получить такие формы белка, которые в принципе могут найти применение не только при проведении фундаментальных работ по изучению механизма действия этого фермента, но и в прикладных биоинженерных работах.

По экспериментальной части есть несколько замечаний и комментариев, которые, безусловно, не умаляют ценности проведенного исследования.

Следовало бы пояснить следующую фразу: «Сравнение констант скорости для фермента ДТ, полученные ранее в работе [222], и мутантных форм Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala показало, что их величины значительно отличаются» (стр. 102). Авторы объясняют это использованием для расчетов разных кинетических схем. С учетом того, что обе работы вышли из одной лаборатории, можно было бы пересчитать все результаты по одинаковым схемам.

Авторы получили белки, содержащие «гис-таг». Удаляли ли его после получения фермента, не мешал ли этот фрагмент сворачиванию белка, не обусловлено ли присутствие примесей на электрофореграммах (рис. 12) выделением за этот «таг» укороченных форм белка, возникших в результате протеолиза.

В работе содержится небольшое количество опечаток и неточностей.

### **Заключение.**

Диссертационная работа Булыгина Анатолия Алексеевича «Анализ молекулярного механизма субстратной специфичности апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазы и рациональный дизайн фермента с изменёнными свойствами», представленную к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия, представляет собой завершённое научное исследование, в котором решена

важная для биохимии задача, а именно проведен анализ молекулярного механизма функционирования апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы и получены мутантные формы этого фермента с измененными каталитическими свойствами.

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:

Муронец Владимир Израилевич,  
Заведующий отделом биохимии животной  
клетки НИИ физико-химической биологии им.  
А.Н. Белозерского МГУ  
д.б.н., профессор

119991, г. Москва,  
Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 40  
телефон: +7(495) 939-14-56  
e-mail:

подпись д.б.н. Муронца В.И. заверяю

И.О. директора НИИ ФХБ  
им. А.Н. Белозерского МГУ  
чл.корр. РАН П.В. Сергиев  
телефон: +7 (495) 939-53-59  
e-mail: [sergiev@belozersky.msu.ru](mailto:sergiev@belozersky.msu.ru)



дата отзыва: «31» марта 2026 г.