

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.

Диссертационная работа Булыгина Анатолия Алексеевича посвящена изучению механизма функционирования АП-эндонуклеаз и, в частности, уникальной специфичности этих ферментов. Эти белки являются одними из ключевых ферментов системы репарации ДНК и потому представляет особый интерес как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте. Актуальность исследования обусловлена недостатком или отсутствием знаний о механизме функционирования этих ферментов, которые могли бы пролить свет на важнейшие процессы репарации ДНК, подвергающейся многочисленным и разнообразным повреждениям под влиянием ряда экзо- и эндо-факторов.

В рамках данной работы выполнено исследование, направленное на выяснение механизма работы АП-эндонуклеаз, включающее определение принципиальных этапов, обуславливающих субстратную специфичность ферментов данного класса с применением методов молекулярной динамики. Составленные прогнозы о ключевой роли некоторых аминокислот далее экспериментально подтверждены на примере белка zAPE1: мутантные варианты с заменой предполагаемых ключевых аминокислот обладают изменённой субстратной специфичностью по сравнению с белком дикого типа.

Диссертационная работа Булыгина А.А. представляет собой актуальную, комплексную работу, в которой органично сочетаются исследования, выполненные как с помощью современных вычислительных технологий так на основе молекулярно-генетических и биохимических методов.

Научная новизна и практическая ценность работы

В результате проведенного компьютерного моделирования комплексов АП-эндонуклеаз четырех разных организмов с ДНК-субстратами, содержащими разные повреждения впервые показано, что подобные ферменты подвергаются однотипными конформационным перестройкам при размещении нуклеотидов с поврежденными основаниями в их активном сайте. Впервые установлен ряд аминокислотных остатков,

принимающих ключевое участие в процессе узнавания поврежденных азотистых оснований. Полученные компьютерным моделированием прогнозы подтверждены в ходе последовавших мутационных и кинетических исследований.

Созданные мутантные варианты АП-эндонуклеазы zAPE1 с измененной субстратной специфичностью, и в особенности, с повышенной эффективностью гидролитического расщепления ДНК с поврежденными основаниями обладают несомненной практической ценностью для фундаментальных и прикладных исследований.

Структура и общая характеристика работы

Диссертационная работа изложена на 141 страницах машинописного текста, содержит 56 рисунков, 2 схемы и 15 таблиц. Работа включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, Список цитируемой литературы (содержит 250 библиографических ссылок).

Во Введении диссертантом обоснована актуальность исследования и сформулированы цель работы и задачи, которые необходимо решить для ее достижения.

В главе 1 проведен анализ литературных данных по созданию ферментов с новыми полезными свойствами. Рассмотрены теоретические методы прогнозирования состояний белковых молекул и их комплексов с олигонуклеотидами и различными лигандами. Изложены основные принципы моделирования различных молекулярных систем, их преимущества и ограничения. Приведены примеры исследований на их основе. В этом разделе также проанализированы литературные данные о ферментах репарации и, в частности, об апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазах, их свойствах и структурных особенностях. Обзор написан ясным научным языком, хорошо структурирован и охватывает материалы, непосредственно связанные с тематикой проведенного исследования. В заключении к этой главе приведено обоснование выбранной цели исследования, поставленных задач и обозначены методы, которыми они будут решаться.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» подробно представлены материалы и процедуры, использованные в работе. Описаны подходы, использованные для компьютерного моделирования, а также при проведении молекулярно-генетических и биохимических экспериментов. Раздел демонстрирует широкий арсенал современных теоретических и экспериментальных методов, которыми владеет диссертант, что характеризует его как высококлассного почти универсального специалиста.

Глава 3 – «Результаты и их обсуждение», составляет около половины объема диссертации. В ней изложены полученные в результате теоретических и экспериментальных исследований данные и проведен их подробный анализ.

В целом работа оставляет приятное впечатление, в тексте практически отсутствуют опечатки, рисунки информативны, а комментарии исчерпывающие.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов

Достоверность полученных диссертантом результатов подтверждена достаточным объемом данных, использованием в работе современного оборудования и программного обеспечения, а также использованная при интерпретации данных статистическая обработка результатов. Сделаны выводы являются обоснованными, опираются на полученные результаты и не противоречат литературным данным.

По теме диссертации опубликовано 4 статьи, в специализированных научных журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus (все относятся к Q1, УБС 1). Во всех публикациях А.А. Булыгин является первым соавтором.

Замечания и предложения.

В главе 2 «Материалы и методы исследования», поскольку модельные олигонуклеотиды не были получены автором самостоятельно, описание их синтеза и очистки можно было опустить.

Возможно, имеет смысл привести краткую характеристику zAPE1, использованную в работе (приведена только ссылка на плазмиду, которую использовали для экспрессии белков), а также картинку со взаимным расположением молекул ДНК и фермента, из которой понятно, например, что наличие His-tag на конце молекулы не влияет на структуру комплекса.

К сожалению, рисунки в Автореферате не цветные и, очевидно, комментарии типа «...бежевый цвет», «..голубое, розовое, зеленое..» и т.п. теряют смысл.

Замечания не являются критическими, носят рекомендательный характер и никоим образом не снижают научно-практическую ценность диссертации

Заключение.

Диссертационная работа 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, представляет собой завершённое научное исследование, в котором диссертант на основе проведенного молекулярно-динамического моделирования комплексов ряда АПЕ1-подобных АП-эндонуклеаз с ДНК-субстратами, содержащими поврежденные нуклеотиды, определил ключевые аминокислотные остатки активного центра, взаимодействующие с поврежденным основанием и определяющих субстратную

