ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Булгакова Никиты Алексеевича
«Физико-химические основы субстратной специфичности ДНК-гликозилаз суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль»,
представленной к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. – биохимия

Диссертация Н.А. Булгакова посвящена актуальной проблеме современной биохимии и молекулярной биологии — выяснению физико-химических механизмов, определяющих субстратную специфичность ферментов репарации ДНК из суперсемейства «спираль-2 поворота-спираль» (H2tH). Работа сфокусирована на двух репрезентативных белках — формамидопиримидин-ДНК-гликозилазе (Fpg) и эндонуклеазе VIII (Nei), которые узнают окислительные повреждения ДНК, относящиеся к одному из самых частых и опасных для клетки классов повреждений. Актуальность темы не вызывает сомнений: окислительные повреждения, прежде всего 8-оксогуанин, приводят к трансверсиям и связаны с онкологическими заболеваниями, а ингибиторы бактериальных ДНК-гликозилаз рассматриваются как перспективный путь преодоления антибиотикорезистентности.

В работе чётко сформулированы цель и задачи, направленные на установление роли электростатики активного центра Fpg, вклада тетрапептидной петли 219–222 в узнавание 8-оксогуанина и структурных основ толерантности Nei к основанию напротив повреждения. Н.А. Булгаков использовал широкий набор современных методов: сайт-направленный мутагенез, кинетические измерения взаимодействия белков с радиоактивно- и флуоресцентно меченными фрагментами ДНК. Хочется отметить, что автору пришлось освоить сложнейшие физические методы и связанный с ними математический аппарат, а именно спектроскопию непрерывного электронного парамагнитного резонанса и модуляцию огибающей сигналов электронного спинового эха с pH-чувствительной нитроксильной спин-меткой, макромолекулярную рентгеновскую дифракцию, молекулярно-динамическое моделирование и биоинформатический анализ. Количество применяемых методов и научная эрудиция Н.А. Булгакова впечатляют и ставят высокую планку для последующих соискателей кандидатской степени в этой области науки.

Научная новизна исследований несомненна. Впервые экспериментально зарегистрировано смещение pKa спиновой метки в активном центре неактивного варианта Fpg(E2Q), что свидетельствует об участии остатка Glu2 в переносе протона. Получена и охарактеризована библиотека мутантных форм Fpg из *L. lactis* с рандомизированной петлёй 219–222, показан её специфический вклад в узнавание 8-оксогуанина. Впервые получены кристаллические структуры ковалентных связанных комплексов Nei с ДНК, содержащей C, G или T напротив повреждения, и установлено, что пиримидиновые основания переходят в *син*-конформацию, тогда как пуриновые основания сохраняют *анти*-конформацию и образуют водородную связь с Gln69. Теоретическая и практическая значимость работы заключается в создании методического подхода для измерения электростатики активного центра фермента в комплексе с ДНК, а также в обосновании стратегии белковой инженерии ферментов с заданной специфичностью и разработки ингибиторов бактериальных ДНК-гликозилаз. Н.А. Булгаков даже «замахнулся» на обсуждение места исследуемых белков в эволюции Земли, что заставляет читателей задуматься о более углубленном изучении функционально родственных ферментов в этом контексте.

Выполненная работа является цельным, логически выстроенным исследованием, которое дает целостную физико-химическую картину функционирования ферментов рассматриваемого суперсемейства. Результаты исследования Н.А. Булгакова прошли апробацию: опубликовано 3 статьи в рецензируемых международных журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus.

К автореферату имеются следующие замечания.

1. В первой части работы при интерпретации смещения pKa спиновой метки в неактивном варианте Fpg(E2Q) на 0,5 ± 0,1 было бы полезно более подробно пояснить, как авторы разделяют вклад собственно замены Glu2 на Gln и возможных конформационных

перестроек активного центра. Указано, что общая укладка белка и сродство к ДНК сохраняются, однако для строгого отнесения наблюдаемого эффекта именно к электростатике каталитической диады Pro1–Glu2 желательно было бы явно привести соответствующие контроли и критерии их оценки.

2. В разделе 3 автореферата на стр. 15, что Н.А. Булгаков пишет о том, что для кристаллизации с Nei были использованы дуплексы ДНК, содержащие C, G или T напротив повреждения. Далее автор сравнивает полученные структуры со структурой комплекса Nei с ДНК, содержащей A напротив повреждения. Следовало бы пояснить, получен ли такой комплекс автором, является ли он ковалентно связанным, или он охарактеризован в другой научной группе, насколько допустимо его сопоставление со структурами, полученными Н.А. Булгаковым.

3. Для детального понимания работы не хватает хотя бы схематического изображения архитектуры суперсемейства H2tH и расположения ключевых элементов — каталитической диады Pro1–Glu2, петли 219–222 и интеркалирующей петли 69–71. Отсутствие таких схем затрудняет восприятие материала читателем, не знакомым с деталями строения этих ферментов.

4. В химии конъюгат уже означает комплекс двух соединений, связанных ковалентной связью. Поэтому писать ковалентный конъюгат неверно.

Указанные замечания носят рекомендательный характер и не снижают общей высокой оценки работы. Автореферат написан чётко, логично и в полной мере отражает содержание и значимость выполненного исследования.

В целом, диссертация Булгакова Н.А. является завершенной научно-квалификационной работой и соответствует критериям, установленным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Тема и содержание работы соответствуют паспорту специальности, а ее автор – Булгаков Никита Алексеевич – заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических 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

Даю свое согласие на включение моих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета и их дальнейшую обработку.

д.х.н. _____ Е.А. Кубарева

«15» ноября 2026

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

Н.Н. Сидорова