ОТЗЫВ

на автореферат диссертации **Булгакова Никиты Алексеевича**

«Физико-химические основы субстратной специфичности ДНК-гликозилаз суперсемейства „спираль–2 поворота–спираль“»,

представленной на соискание ученой степени
кандидата химических наук по специальности
1.5.4 — биохимия

Диссертационная работа Булгакова Н.А. выполнена в области физико-химической биологии ферментов репарации ДНК и посвящена механизмам узнавания окислительных повреждений ферментами суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль» (H2tH). Работа объединяет три независимых направления: экспериментальную оценку электростатического потенциала в активном центре формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы (Fpg) методами ЭПР-спектроскопии pH-чувствительной спин-метки, конъюгированной с ДНК-лигандом; анализ вклада тетрапептидной петли С-концевого домена Fpg в узнавание 8-оксогуанина на библиотеке вариантов со случайными заменами; установление структурного механизма толерантности эндонуклеазы VIII (Nei) к основанию напротив повреждения по серии кристаллических структур ковалентных конъюгатов фермент–ДНК.

Актуальность темы не вызывает сомнений. Окислительные повреждения представляют собой самый распространённый класс повреждений ДНК, а ферменты суперсемейства H2tH — первое звено их эксцизионной репарации у бактерий. Несмотря на значительный объём накопленных данных (решено более сотни структур, охарактеризован каталитический аппарат, измерены константы отдельных стадий), ключевые физико-химические параметры узнавания до сих пор приходится восстанавливать по косвенным свидетельствам: ионизация каталитической диады Pro1–Glu2 известна только из расчётов, вклад петли, координирующей повреждённое основание, не измерен для разных субстратов, а структурный механизм толерантности Nei к основанию напротив повреждения до настоящей работы не был показан вовсе. Особую ценность работе придаёт то, что соискатель не ограничивается описанием явления, а последовательно связывает электростатику каталитического аппарата, конформационную динамику петли и наблюдаемую субстратную специфичность. Отдельного внимания заслуживает прикладная

направленность работы: связь нокаутов по *fpg* и *nei* с чувствительностью бактерий к антибиотикам делает бактериальные ДНК-гликозилазы мишенью для преодоления антибиотикорезистентности, а связь 8-оксогуанина с мутационными сигнатурами SBS18 и SBS36 в опухолях человека подчёркивает медицинскую значимость тематики.

Научная новизна и практическая значимость работы, судя по автореферату, заключаются в следующем:

1. Впервые разработан и применён к белково-нуклеиновому комплексу подход к экспериментальной оценке электростатического потенциала в активном центре фермента, связанного с ДНК-субстратом, основанный на pH-чувствительной нитроксильной спин-метке, конъюгированной с лигандом. Приём методически изящен: прямые методы здесь работают плохо (ЯМР требует изотопно-меченного белка, а расчёты по Пуассону–Больцману опираются на статическую структуру), тогда как метки такого типа к ферментам, работающим с нуклеиновыми кислотами, до настоящей работы не применялись. Существенно, что метка выступает именно репортёром: расстояние 8,9 ± 0,5 Å до α-аминогруппы Pro1 достаточно велико, чтобы не возмущать каталитическую диаду, и достаточно мало, чтобы регистрировать создаваемый ею потенциал; положение метки подтверждено совпадением расчётной (0,56) и измеренной методом ESEEM (0,52 ± 0,06) доступности растворителя.

2. Наиболее сильной частью первой главы считаю выстроенный соискателем градиент значений pK_a метки: свободный дуплекс (7,7–7,8) → связывание фермента при двухнуклеотидной бреши (−0,5 ед.) → сокращение бреши на один нуклеотид (ещё −0,4 ед.) → замена Glu2 на изоморфный по объёму, но электронейтральный Gln (возврат примерно на ту же величину). Такая декомпозиция превращает единичное измерение в содержательное доказательство того, что метка регистрирует именно вклад остатков активного центра, а не ДНК-связывающего канала в целом. Ценным представляется и сопоставление с клиническими данными: замены Glu2 описаны как соматические мутации в опухолях для всех трёх человеческих гомологов EcoFpg, и работа впервые даёт механистическое объяснение их инактивирующего действия.

3. Логически замкнутым является дизайн второй главы. Рандомизация тетрапептида вместо точечных замен позволяет ответить на вопрос о необходимости конкретной последовательности без перебора вариантов, а система внутренних контролей выстроена так, что результат допускает единственное прочтение: АП-сайт как субстрат, при расщеплении которого петля не требуется; дифференциальная

сканирующая флуориметрия для контроля укладки; образование ковалентного комплекса в присутствии NaBH□ для контроля механизма; константы диссоциации для контроля сродства. Падение активности на 8-oxoG на 2–3 порядка при сохранении укладки, наномолярного сродства и механизма β/δ-элиминирования не может быть отнесено ни к дестабилизации белка, ни к потере связывания. Биохимический результат подтверждён in vivo комплементационным тестом в штамме *E. coli* CC104 *fpg mutY*.

4. Корреляция относительной активности с долей молекулярно-динамической траектории, проведённой петлёй в «активной» конформации ($r = 0{,}830$ при $p < 0{,}001$ на 66 траекториях), подкреплена анализом устойчивости методом Монте-Карло: индекс устойчивости 0,63, а исключение всех траекторий с 8-oxoG практически не меняет результат ($r = 0{,}826$). Это снимает основное возражение о том, что корреляция держится на одной группе точек.

5. Впервые получены кристаллические структуры ковалентных конъюгатов Nei *E. coli* с ДНК, содержащей C, G или T напротив повреждения, и обнаружено, что пиримидиновые основания напротив повреждения переходят в син-конформацию, изолируя Уотсон–Криковскую грань от контактов с белком, тогда как пуриновые сохраняют анти-конформацию и образуют водородную связь с Gln69 интеркалирующей петли. Наиболее ценным здесь считаю не сами структуры, а то, что из неожиданного структурного наблюдения выведено фальсифицируемое предсказание (объёмный заместитель при C5 пиримидина напротив повреждения должен стерически мешать размещению нуклеотида в спирали) и тут же проверено независимым методом на субстратах с 5-этинилурацилом и 5-(окта-1,7-диин-1-ил)-урацилом. При этом распределение эффекта между параметрами оказалось именно таким, какого требует стерическая модель: K_M растёт заметно сильнее, чем падает k_{cat}.

6. Практическая значимость работы связана прежде всего с методическим результатом: схема «метка в бреши — ESEEM-контроль доступности растворителя — МД-локализация» применима к любому белку, для которого удаётся собрать спин-меченый лиганд вблизи интересующего центра, и в этом смысле выходит далеко за пределы репарации ДНК. Второе направление — белковая инженерия: показано, что специфичность к 8-oxoG задаётся коротким и слабо консервативным участком, перестройка которого не разрушает ни укладку белка, ни его сродство к

ДНК, что делает петлю разумной мишенью для направленной перенастройки субстратной специфичности H2tH-ферментов.

Достоверность результатов обеспечена использованием комплекса взаимодополняющих экспериментальных подходов (спектроскопия непрерывного ЭПР и ESEEM, макромолекулярная рентгеновская дифракция, стационарная кинетика и кинетика одного оборота, микромасштабный термофорез, задержка в геле, дифференциальная сканирующая флуориметрия, комплементационный тест на мутаторном штамме) в сочетании с молекулярно-динамическим моделированием и биоинформатическим анализом последовательностей и структур. Качество структурных данных не вызывает нареканий: разрешение 1,75–1,85 Å при R_{work}/R_{free} 18,7/21,6, 19,4/23,7 и 20,7/23,7 % свидетельствует о корректно уточнённых моделях, а депонирование структур в Protein Data Bank (9VRM, 9VR3, 9VR4) обеспечивает возможность независимой проверки выводов. Результаты работы опубликованы в трёх статьях в рецензируемых международных изданиях (*The Journal of Physical Chemistry B*, *Biochemistry*, *DNA Repair*), индексируемых в базах Web of Science и Scopus, причём статьи соответствуют трём главам работы, то есть опубликованы именно основные, а не побочные результаты.

Тем не менее, при ознакомлении с текстом автореферата, возникло два уточняющих вопроса:

1. Снижение константы специфичности k_{cat}/K_M всего в 4,1 и 7,2 раза для субстратов с 5-этилурацилом (EtU) и 5-(окта-1,7-диин-1-ил)-урацилом (C8-AlkU) представляется скромным для полного стерического запрета размещения нуклеотида в спирали. Какова, по Вашей оценке, доля анти-конформации нуклеотида напротив повреждения в растворе и можно ли её оценить независимо?
2. Какой из полученных результатов — электростатика каталитической диады или геометрия петли, координирующей повреждённое основание, — Вы считаете более перспективной основой для разработки ингибиторов бактериальных ДНК-гликозилаз?

Сделанные замечания носят дискуссионный или уточняющий характер, не затрагивают основных выводов работы и не снижают её общей высокой оценки. Диссертационная работа Булгакова Н.А. является завершённым научно-квалификационным трудом, в котором решена задача, имеющая значение для развития биохимии ферментов репарации ДНК: разработан и апробирован способ измерения электростатики активного центра фермента непосредственно в комплексе с ДНК-

субстратом, установлен вклад тетрапептидной петли Fpg в узнавание 8-оксогуанина и раскрыт структурный механизм толерантности Nei к основанию напротив повреждения.

Судя по автореферату, диссертация **«Физико-химические основы субстратной специфичности ДНК-гликозилаз суперсемейства „спираль–2 поворота–спираль“»** полностью соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 «Положения о присуждении учёных степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН», предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата химических наук, а её автор, **Булгаков Никита Алексеевич**, заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 — биохимия.

Я, Украинцев Александр Андреевич, даю согласие на включение и дальнейшую обработку своих персональных данных при подготовке документов аттестационного дела соискателя учёной степени.

Украинцев Александр Андреевич

03.11.2026

Кандидат химических наук

Специальность 1.4.9. — Биоорганическая химия

Научный сотрудник лаборатории биоорганической химии ферментов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8.

Тел.: +7 (383) 363-51-96

Электронная почта: ukraintsev_aa@1bio.ru

Подпись Украинцева А.А. заверяю

Учёный секретарь ИХБФМ СО РАН

_____ Логашенко Евгения Борисовна