ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Булгакова Никиты Алексеевича

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

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 - Биохимия

Актуальность исследования

Формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза (Fpg) и эндонуклеаза VIII (Nei) начинают эксцизионную репарацию окислительных повреждений ДНК. Их активные центры устроены сходным образом, при этом Fpg преимущественно удаляет окисленные пурины, а Nei - окисленные пиримидины. Даже если известна структура комплекса с ДНК, по ней трудно судить, как меняется протонирование каталитических остатков и какие контакты определяют выбор субстрата. Н. А. Булгаков рассматривает эти вопросы на примере каталитической пары Pro1-Glu2, петли Fpg, которая охватывает повреждённое основание, и контактов Nei с основанием на противоположной цепи ДНК. Такая постановка задачи позволяет выяснить, какие свойства активного центра необходимы для катализа, а какие определяют субстратную специфичность фермента.

Объем и структура работы.

Диссертация изложена на 146 страницах, содержит 48 рисунков и 21 таблицу. Список литературы включает 277 источников. Во введении автор формулирует цель, задачи и положения, выносимые на защиту. За литературным обзором следуют главы «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение», заключение, выводы, список сокращений и библиография.

В **литературном обзоре** автор систематизирует основные типы повреждений ДНК, механизмы их репарации и современную классификацию ДНК-гликозилаз, подробно разбирает стадии поиска повреждения и каталитический цикл ферментов. Обзор написан ясно, хорошо структурирован и логично подводит читателя к нерешенным вопросам в этой области.

В главе 3 (**Материалы и методы)** описаны протоколы всех использованных подходов, включая биохимические и спектроскопические эксперименты, рентгеноструктурный анализ и расчёты молекулярной динамики.

В главе 4 (**Результаты и обсуждение)** приведены описание и анализ основных результатов, полученных автором.

Раздел 4.1 посвящён исследованию электростатических свойств комплексов формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы (Fpg) *Escherichia coli* — фермента дикого типа и каталитически неактивного мутантного варианта E2Q — с ДНК. В качестве репортёрной группы использована pH-чувствительная нитроксильная спиновая метка имидазолинового ряда, ковалентно присоединённая через гибкий гексаметиленовый линкер к двуцепочечным ДНК-дуплексам, содержащим одно- или двунуклеотидную брешь; такие дуплексы имитируют продукт β,δ-элиминирования, образующийся в ходе

катализируемой ферментом реакции. Методом микромасштабного термофореза установлено, что спин-меченые дуплексы связываются с ферментом с константами диссоциации 2,3–3,7 мкМ. По данным трёхимпульсной ESEEM спектроскопии в дейтерированной водно-глицериновой матрице связывание фермента сопровождается снижением доступности радикального центра метки для молекул растворителя. Этот результат согласуется с данными молекулярно-динамического моделирования, согласно которым метка локализуется на границе раздела белок-ДНК: в комплексе с однонуклеотидной брешью расстояния от радикального центра до каталитических остатков Pro1 и Glu2 составляют около 9 и 14 Å соответственно.

Методом стационарной ЭПР спектроскопии X-диапазона прослежено изменение pKa спиновой метки при образовании комплекса с ферментом. Отдельный интерес представляет сопоставление фермента дикого типа и мутантного варианта E2Q. Так, в комплексе с однонуклеотидной брешью замена Glu2 на Gln смещает pKa метки в щелочную область на ~0,5 единицы pH и приводит к появлению дополнительного перегиба на кривой титрования. Наблюдаемый эффект интерпретирован автором как следствие изменения состояния протонирования остатка Pro1. Полученные данные свидетельствуют о чувствительности предложенного подхода к локальному электростатическому окружению метки и о возможности его применения для оценки влияния замен каталитических остатков на это окружение.

Раздел 4.2 посвящён изучению функциональной роли петли 219–222 Fpg *Lactococcus lactis*, амидные группы пептидного остова которой координируют атом O6 8-оксогуанина. На основании сравнительного анализа 428 последовательностей Fpg в работе продемонстрирована вариабельность аминокислотного состава данной петли. Охарактеризованы пять мутантных вариантов фермента, где природная последовательность 219IRTY222 заменена рандомизированными тетрапептидами. Показано, что все варианты сохранили термическую стабильность белковой глобулы, сродство к ДНК с нерасщепляемым аналогом АП-сайта, а также способность расщеплять субстраты с АП-сайтом и 5-гидроксиурацилом. В условиях кинетики одного оборота наблюдаемые константы скорости реакции с 8-оксогуанином снизились на 2–3 порядка. По данным МД моделирования каталитическая активность фермента коррелирует с долей траектории, где петля находится в активной конформации. Совокупность полученных результатов указывает на то, что аминокислотная последовательность петли необходима для поддержания геометрии, обеспечивающей эффективное удаление 8-оксогуанина.

В **разделе 4.3** исследованы структурные особенности комплексов Nei *E. coli* с ДНК, содержащей различные основания напротив повреждения. Получены три кристаллические структуры ковалентных конъюгатов фермент-ДНК с остатками C, G и T в данной позиции с разрешением 1,75–1,85 Å; структуры сопоставлены с ранее опубликованной структурой аналогичного комплекса, содержащего аденин напротив повреждения. Показано, что

пуриновые основания сохраняют анти-конформацию относительно N-гликозидной связи и образуют водородную связь с остатком Gln69, тогда как пиримидиновые основания находятся в син-конформации и прямых контактов с белком не образуют; остаток Gln69 при этом взаимодействует с соседним остатком гуанина. Для проверки предложенной структурной модели в работе исследованы субстраты, содержащие напротив повреждения пиримидиновые основания с объёмными заместителями при атоме C5. Константа специфичности реакции с такими субстратами снижалась в 4–7 раз. Полученные кинетические данные согласуются с представлением о том, что объёмный заместитель при C5 стерически затрудняет размещение пиримидинового основания в геометрии, наблюдаемой в кристаллических структурах.

Заключение и выводы обобщают полученные результаты и полностью подтверждаются приведенными данными.

Научная новизна и практическая значимость результатов связаны с предложенным способом исследовать локальное электростатическое окружение ДНК-гликозилазы, а также с новыми данными о роли петли Fpg в узнавании повреждения и о структуре комплексов Nei с ДНК. В работе pH-чувствительную спиновую метку впервые использовали в составе ДНК-лиганда для изучения электростатического окружения вблизи каталитических остатков Fpg. Такой подход позволил экспериментально показать, что замена Glu2 на Gln меняет локальное окружение метки, и оценить вклад этой замены в работу каталитической пары Pro1-Glu2.

Для Fpg из *Lactococcus lactis* впервые исследована серия вариантов со случайными тетрапептидами в петле 219–222. Установлено, что аминокислотный состав петли важен для реакции с 8-оксогуанином, тогда как активность на АП-сайте и 5-гидроксиурациле сохраняется. В кристаллических комплексах Nei с ДНК обнаружена ранее не описанная для ДНК-гликозилаз син-конформация пиримидинов напротив повреждения. Полученные структуры объясняют, как фермент размещает в комплексе разные основания в этой позиции.

Предложенный ЭПР-подход применим к другим комплексам белка с ДНК в тех случаях, когда удается ввести спиновую метку рядом с целевыми остатками. Результаты по Fpg позволяют выбирать аминокислотные замены для дальнейшего изучения и изменения субстратной специфичности фермента. Полученные в работе структуры комплексов Nei депонированы в Protein Data Bank и доступны для дальнейших структурных и расчетных исследований.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность результатов обусловлена применением комплекса современных методов исследования и не вызывает сомнений. Выводы обоснованы и полностью основаны на полученных данных. Основные результаты исследований приведены в 3 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах, индексируемых Web of Science и Scopus и

рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и были представлены на конференциях.

Публикации полностью отражают основное содержание диссертации. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертации. Работа хорошо написана, легко читается и содержит небольшое количество опечаток и неточностей.

Замечания

Работа лишена принципиальных недостатков, тем не менее, при прочтении возникли следующие замечания и вопросы:

1. Доля метки, связанной с ферментом, по данным непрерывного ЭПР составляет 0,35–0,47 (Таблица 12). В разделе 3.2.10 не указаны концентрации фермента и ДНК в образцах для ESEEM. При каких концентрациях определены эти доли и как они согласуются с измеренными константами диссоциации? Вопрос является важным, поскольку поправка на долю несвязанной метки входит в расчёт величины $\alpha_{Fpg\text{-}ДНК}$.
2. В экспериментах ESEEM (Таблица 12) составы водно-глицериновых смесей различались по содержанию дейтерированной воды: для свободных дуплексов 50 % D_2O, для комплексов с ферментом дикого типа 13,6 %, для комплексов с мутантом E2Q 9,3 % при постоянном содержании глицерина-d_8 50 %. Разница концентраций учитывается линейной калибровкой, полученной на свободной метке в объёмном растворе. Однако молекулы глицерина и воды заметно различаются по размеру, и в узком ДНК-связывающем канале белка возможно преимущественное исключение глицерина из гидратной оболочки радикального центра. Насколько корректен перенос калибровочных коэффициентов с объёмного раствора на границу раздела белок-ДНК? Проверялась ли линейность отклика на связанном образце при двух различных долях D_2O? Чем обусловлен выбор разных долей D_2O для фермента дикого типа и мутантного варианта, поскольку это вносит систематическую погрешность именно в ключевое для работы сравнение?
3. В работе появление буферного плеча на кривой титрования комплекса EcoFpg-E2Q-gap1-NO в интервале pH 7,00–7,37 связывается с ионизацией N-концевого остатка Pro1. Обоснование строится методом исключения иных титруемых групп в окрестности метки. Остаток Pro1 присутствует также в ферменте дикого типа, а геометрия комплекса согласно тексту работы при замене E2Q не меняется. Возникает вопрос: почему у дикого типа вся кривая в том же интервале pH описывается единственной константой pKa?
4. В разд. 3.2.10 указано, что измерения ESEEM проводили при pH 7,76, а в заголовке Таблицы 12 (с. 76) приведено значение pH 8,14. Какое из этих значений соответствует действительным условиям эксперимента? Если измерения проводили при pH 8,14, то как это согласуется с титрованием спиновой метки, где pKa комплексов лежит в области pH 7–7,4, и влияет ли степень протонирования метки на величину $\alpha_{Fpg\text{-}ДНК}$?

Высказанные замечания и вопросы носят технический или дискуссионный характер, не затрагивают сути основных положений работы и не снижают её общей высокой оценки.

Заключение

Диссертация Булгакова Никиты Алексеевича, представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук, выполнена на высоком научном уровне и является завершенной научно-квалификационной работой. В ней решена важная научная задача по установлению физико-химических и структурных факторов, влияющих на субстратную специфичность ДНК-гликозилаз суперсемейства «спираль — два поворота — спираль». Полученные результаты имеют важное значение для биохимии, молекулярной биологии и биофизики ферментов репарации ДНК.

Диссертационная работа Булгакова Н. А. полностью соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в ИХБФМ СО РАН, а её автор, Булгаков Никита Алексеевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Крумкачева Олеся Анатольевна
доктор физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук (МТЦ СО РАН)
630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3а
e-mail: olesya@tomo.nsc.ru
Тел. +7 (383) 330-75-47

_____ Крумкачева О. А.
«12» ноября 2026 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук (МТЦ СО РАН)
Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3а, Институт «Международный томографический центр» СО РАН
Контактный телефон МТЦ СО РАН: +7 (383) 333-14-48; факс: +7 (383) 333-13-99; E-mail: itc@tomo.nsc.ru; адрес официального сайта: https://tomo.nsc.ru/

Подпись О. А. Крумкачевой заверяю
Учёный секретарь МТЦ СО РАН, кандидат химических наук

_____ Л. В. Яньшоле
«12» ноября 2026 г.