ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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

Изучение механизмов узнавания и удаления многочисленных и самых разнообразных повреждений ДНК ДНК-гликозилазами представляет актуальную проблему, поскольку эта область связана как с пониманием фундаментальных механизмов сохранения генома, так и с решением практических задач по созданию ферментов с заданной специфичностью и разработке ингибиторов систем репарации. Диссертационная работа посвящена изучению механизмов функционирования бактериальных ДНК-гликозилаз двух главных групп одного структурного суперсемейства: формамидопиримидин-ДНК-гликозилаз (Fpg) *E. coli* и *L. lactis* и эндонуклеазы VIII (Nei) *E. coli,* ответственных за удаление окисленных азотистых оснований ДНК. Работа представляет собой комплексное исследование, выполненное с применением самых разнообразных физико-химических методов, сайт-направленного мутагенеза белков, кинетических методов ферментативного катализа, кристаллографии и рентгеноструктурного анализа комплексов белков с ДНК.

Диссертация состоит из традиционных частей. Во введении обоснована актуальность исследования, четко сформулированы цель и задачи работы, ее научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость. Соискатель подробно описал свой личный вклад и какие исследования выполнены соавторами публикаций.

В литературном обзоре описаны все типы повреждений ДНК и в кратком виде известные системы их репарации. Основная часть обзора содержит многочисленные сведения по механизмам действия ДНК-гликозилаз и их структурно-функциональному разнообразию. Данные для наиболее хорошо изученного суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль» хорошо систематизированы и проиллюстрированы. В целом, обзор хорошо написан, с интересом читается и содержит достаточно информации об исследуемых объектах и их биологической значимости. Рисунок 17 на стр. 44 обзора не упоминается в тексте.

В разделе «Материалы и методы» достаточно подробно описаны все использованные в работе материалы и методы для получения препаратов ферментов и модельных ДНК-субстратов, инструментальные методики для ЭПР-экспериментов, кристаллографических и рентгеноструктурных исследований, а также кинетического анализа каталитической активности ферментов.

В основной части диссертации представлены результаты исследований, сгруппированные в три независимых блока. В первом блоке изучен электростатический потенциал активного центра Fpg *E. coli* методом ЭПР. Для этого оригинального подхода создан ряд модельных ДНК, содержащих pH-чувствительную спин-метку на 3'- или 5-конце одно- или двунуклеотидной бреши, и с помощью метода ESEEM найдены оптимальные структуры для регистрации сигналов в комплексах с ферментом дикого типа и его мутантом. Обнаруженное изменение константы ионизации (pK_a) спин-метки при инактивирующей замене остатка глутаминовой кислоты на глутамин (E2Q) подтверждает каталитическую роль этого остатка в переносе протона в процессе ферментативной реакции. Разработанный подход может применяться для других белок-нуклеиновых комплексов.

Во втором блоке изучен механизм распознавания окислительных повреждений ДНК ферментом Fpg *L. lactis* с участием функционально важной петли из 4-х аминокислотных остатков 219-222. Выполнен анализ консервативности этого мотива для получения пяти вариантов фермента с рандомизированным составом петли. Кинетические исследования активности мутантов в расщеплении субстратов, содержащих апурин-апиримидиновый сайт, 5-гидроксиурацил или 8-оксогуанин, показали ключевую роль петли в узнавании окисленных пуринов. Значительное снижение активности мутантных форм в удалении 8-oxoG в составе клеточной хромосомы показано с использованием штамма *E. coli,* в котором инактивированы основные системы защиты от мутагенного действия данного повреждения. Результаты имеют практическое значение для создания новых молекулярно-биологических инструментов путём изменения субстратной специфичности ДНК-гликозилаз к синтетическим аналогам азотистых оснований. К этой части работы имеется несколько замечаний. Для оценки степени распознавания основных и неосновных субстратов *in vitro* следовало определить каталитическую эффективность расщепления 8-oxoG-содержащего субстрата ферментом дикого типа. Для оценки сродства различных вариантов белка к ДНК использован неравновесный метод задержки комплексов в геле (EMSA), который не позволяет измерять истинные термодинамические константы диссоциации, как представлено в Таблице 15. Корректной характеристикой сродства является в этом случае эффективная концентрация полумаксимального связывания (EC_{50}). Кривые связывания (Рис. 33) обычно представляют как зависимость степени связывания лиганда (а не концентрации комплекса) от концентрации белка. На рисунках 34, 36 и 37 в этом разделе перепутаны обозначения белков. Рисунок 41 на стр. 105 не упоминается в тексте.

Третий блок исследований посвящен детальному изучению способности ДНК-гликозилазы Nei *E. coli* удалять окисленные основания ДНК без существенной зависимости от природы основания напротив. В дополнение к известной структуре ковалентного конъюгата этого фермента с ДНК закристаллизованы аналогичные комплексы с тремя другими вариантами того же ДНК-интермедиата, отличающимися природой основания напротив повреждения, и установлена их структура. Изменение конформации нуклеозидов с анти- на син- в случае пиримидинов подтверждено кинетическими экспериментами с ДНК-субстратами, содержащими объемные заместители при атоме С5 в пиримидине. Выявленные различия в молекулярных механизмах распознавания пуринов и пиримидинов объясняют широкую специфичность фермента.

В диссертации имеется заключение, в котором суммированы основные полученные результаты. Текст заключения хорошо написан и дает полное представление об актуальности, новизне и оригинальности выполненных исследований.

Диссертационная работа Н.А. Булгакова представляет собой завершенное исследование, в котором впервые: 1) получено экспериментальное подтверждение каталитической функции остатка глутаминой кислоты Glu2 в формамидопиримидин-ДНК-гликозилазе (Fpg) *E. coli*; 2) установлен ключевой вклад неконсервативной тетрапептидной петли Fpg *L. lactis* в узнавание окисленных пуринов в основных ДНК-субстратах; 3) выявлены различия в молекулярных механизмах распознавания окисленных пуринов и пиримидинов с помощью кристаллизации и рентгеноструктурного анализа ковалентных аддуктов эндонуклеазы VIII (Nei) *E. coli* с модельными ДНК. Полученные соискателем результаты, достоверность которых не вызывает сомнений, значительно дополняют фундаментальные знания о функционировании бактериальных ДНК-гликозилаз и имеют прикладное значение для направленного изменения их свойств. Рукопись диссертации хорошо оформлена и содержит немногочисленные опечатки и неудачные фразы.

Высказанные замечания не снижают ценность работы.

Все результаты диссертации опубликованы в трех статьях в рецензируемых научных журналах соответствующего профиля.

Представленные выводы обоснованы, соответствуют поставленным в диссертационной работе задачам и полностью отражают объём полученного экспериментального материала.

Автореферат диссертации в достаточной мере отражает основное содержание и объем выполненных исследований, соответствующие идеям и выводам.

Диссертация Булгакова Н.А. полностью соответствует требованиям п.п. 2.1-2.5 «Положения о присуждении учёных степеней в Институте химической биологии и

фундаментальной медицины имени Д.Г. Кнорре СО РАН », предъявляемых к кандидатским диссертациям, и соискатель заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Д.х.н., доцент, в.н.с. ИХБФМ СО РАН Моор Н.А.

Подпись Моор Н.А. заверяю

Зам. директора ИХБФМ СО РАН по научной работе, к.х.н. Пестряков П.Е.

12.11.2026

Моор Нина Александровна, д.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биоорганической химии ферментов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины имени Д.Г. Кнорре СО РАН; 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8; тел.: +7 383 363 51 96, E-mail: moor@1bio.ru