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

Диссертационная работа Н. А. Булгакова посвящена физико-химическим механизмам субстратной специфичности ДНК-гликозилаз суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль». Центральная проблема состоит в объяснении того, как сходные по общей архитектуре ферменты различают повреждённые основания, поддерживают каталитически продуктивные состояния и допускают разные нуклеотиды напротив повреждения.

Рассматриваемые в работе ферменты играют ключевую роль в системе репарации ДНК, удаляя окислительные повреждения, что имеет важное значение для поддержания геномной стабильности. Нарушения в работе системы репарации ДНК связаны с возникновением различных заболеваний, включая инфекционные и онкологические. Понимание механизмов распознавания и удаления повреждений ДНК гликозилазами могут быть использованы для разработки противоопухолевых лекарственных средств и препаратов для преодоления антибиотикорезистентности.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 146 страницах и включает введение, литературный обзор, главу с описанием материалов и методов, главу с результатами и их обсуждением, заключение, список сокращений и условных обозначений, а также библиографический список, насчитывающий 277 источников, из которых 26 за последние пять лет. Структура работы логична и соответствует требованиям к диссертационным исследованиям. Литературный обзор выполнен на высоком уровне и позволяет читателю полноценно ознакомиться с современным состоянием проблемы.

Литературный обзор посвящен описанию различных повреждений в ДНК и их влиянии на структуру ДНК, а также системам репарации и структурным суперсемействам ДНК-гликозилаз эксцизионной системы репарации с обширным обзором суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль». Обзор написан хорошо и подробно, что позволяет как ввести читателя в тему исследования, так и для постановки задач диссертационной работы.

В **экспериментальной части** описываются методы исследований и приводятся данные, необходимые для анализа полученных автором результатов и проверки их достоверности. Высокая достоверность полученных результатов и выводов обоснована применением комплекса современных научных экспериментальных подходов.

В главе «**Результаты и обсуждение**» приведены описание и анализ основных результатов, полученных автором.

На первом этапе автором разработан оригинальный подход к оценке электростатического потенциала в активном центре ДНК-гликозилаз с использованием нитроксильной спин-метки, ковалентно встроенной в ДНК-субстрат. Проведённые работы позволили получить набор значений pKa, образующий градиент электростатического влияния белка: свободная метка в ДНК-дуплексе даёт pKa 7,7–7,8, связывание Fpg дикого типа из *Escherichia coli* с нитроксильной спин-меткой, располагающейся в двунуклеотидной бреши (gap2-NO•), снижает pKa до 7,20 ± 0,06 за счёт вклада ДНК-связывающего канала, а сближение спин-метки, располагающейся в однонуклеотидной бреши (gap1-NO•), с активным центром приводит к дополнительному сдвигу до 6,80 ± 0,03. Впервые экспериментально показано, что замена Glu2 на электронейтральный Gln2 (мутантный вариант E2Q) вызывает появление буферного плеча в диапазоне pH 7,00–7,37, однозначно связываемого с ионизацией остатка Pro1. С использованием полученных данных подтверждено, что ионизация каталитической пары Pro1–Glu2 в активном центре отличается от референсных значений изолированных аминокислот и зависит от наличия остатка Glu2, что инактивирует фермент отчасти через утрату активации N-концевого остатка пролина.

Н.А. Булгаковым была охарактеризована библиотека мутантных вариантов Fpg *Lactococcus lactis* с рандомизированными заменами в тетрапептидной петле 219–222. Проведённые работы позволили выявить специфический вклад этой петли в узнавание 8-оксогуанина: рандомизация её аминокислотного состава приводит к резкому падению эффективности удаления 8-oxoG при сохранении активности к альтернативным субстратам (АП-сайт, 5-гидроксиурацил). Показано, что петля необходима для правильного позиционирования 8-оксогуанина в сайте связывания и/или сопряжения связывания субстрата с каталитическим аппаратом фермента (остатки Pro1, Glu2, Glu5).

Впервые получены кристаллические структуры ковалентных конъюгатов Nei *E. coli* с ДНК, содержащей C, G или T напротив повреждения (PDB ID: 9VRM, 9VR3, 9VR4). С использованием полученных данных установлен пространственный механизм толерантности EcoNei к основанию напротив повреждения: пуриновые основания (A и G) распознаются единственной неспецифической водородной связью с атомом *N*3, тогда как комплементарные пиримидины поворачиваются на 180° в *син*-конформацию и не образуют специфических контактов с ферментом. Кинетическое подтверждение структурной интерпретации получено в экспериментах: введение объёмного заместителя в положение C5 пиримидинового кольца снижает константу специфичности EcoNei в 4,1–7,2 раза, преимущественно за счёт увеличения K_M.

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

Научная новизна и практическая значимость

Научная новизна диссертационной работы Булгакова Н.А. не вызывает сомнений. Один из принципиальных результатов состоит в применении pH-чувствительного нитроксильного зонда в составе ДНК-лиганда для сопоставления локального окружения активного центра EcoFpg и варианта E2Q. Совместное использование непрерывного ЭПР,

ESEEM, измерения связывания и молекулярной динамики существенно усиливает интерпретацию наблюдений. Впервые разработан оригинальный методический подход к экспериментальной оценке электростатического потенциала в активном центре ДНК-гликозилаз, связанных с ДНК-субстратом, основанный на использовании нитроксильной спин-метки и методов непрерывного ЭПР и ESEEM. Этот подход позволил экспериментально зарегистрировать смещение pKa спин-метки в активном центре инактивирующего мутанта E2Q Fpg *E. coli* относительно фермента дикого типа, что отражает изменение электростатики каталитической диады аминокислотных остатков Pro1–Glu2.

В работе получена и охарактеризована библиотека мутантных вариантов Fpg *L. lactis* с рандомизированными заменами в тетрапептидной петле 219–222. Это позволило провести функциональное разделение роли петли 219–222 в распознавании 8-oxoG и сохранении активности на альтернативных субстратах. Для пяти вариантов приведён комплекс данных о термостабильности, связывании, образовании ковалентного промежуточного соединения и ферментативной активности.

Впервые получены кристаллические структуры ковалентных конъюгатов Nei *E. coli* с ДНК, содержащей разные основания напротив повреждения. Автором установлено, что пиримидиновые основания напротив повреждения переходят в *син*-конформацию относительно *N*-гликозидной связи, тогда как пуриновые основания сохраняют *анти*-конформацию и образуют водородную связь с остатком Gln69 интеркалирующей петли 69–71.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты вносят значительный вклад в понимание структурно-функциональных основ работы ДНК-гликозилаз. Разработанный подход к оценке электростатического потенциала в активном центре может быть использован для изучения других ферментов, а в совокупности со структурными данными ферментов суперсемейства H2tH может использоваться также для разработки ингибиторов ДНК-гликозилаз, что представляет интерес для создания новых противоопухолевых препаратов. Кроме того, полученные данные могут быть использованы в биотехнологии для создания ферментов с заданными свойствами.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность результатов, полученных в диссертационной работе, не вызывает сомнений. Автором использован комплекс современных экспериментальных методов, включая спектроскопию ЭПР, ESEEM, рентгеноструктурный анализ, сайт-направленный мутагенез, ферментативные кинетики (стационарная кинетика, кинетика одного оборота). Все ключевые результаты подкреплены экспериментальными данными и статистическим анализом. в 3 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах, индексируемых Web of Science и Scopus и рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, что подтверждает высокий уровень исследования. Цель и задачи соотносятся с экспериментальными разделами.

Публикации полностью отражают основное содержание диссертации. Содержание автореферата полностью соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы.

Работа написана четким научным языком, хорошо структурирована и содержит минимальное количество опечаток.

Замечания

Важной частью работы является исследование вклада петли 219-222 в узнавание 8-оксогуанина. Было получено пять мутантных форм, указано, что ранодмизированных, однако, рандомизация подразумевает случайный выбор замененного аминокислотного остатка. В этой связи не ясно, использованные в работе пять мутантных форм – случайно выбранные из определенного пула мутантных вариантов или осознано полученные? Если случано выбранные, то почему остановились на пяти вариантах, а не, например, трех или десяти? Если осознано, то какими соображениями руководствовался автор работы для каждого из вариантов?

В настоящей редакции пять предварительно отобранных конструкций не являются случайной репрезентативной выборкой всего пространства вариантов петель. Таким образом, вывод об эволюционном происхождении специфичности остаётся гипотезой, а не результатом филогенетической реконструкции.

В последних двух столбцах табл. 6 по вертикали получаются мутантные варианты NPHG и WPGR, тогда как результаты относятся к вариантам NPGR и WPHG, какие последовательности мутантных вариантов верные?

На странице 78 указано: «Первое: pKa свободной спин-метки в составе ДНК-дуплекса находится в пределах 7,7–7,8, и регистрация её перехода между протонированной и депротонированной формами требует охвата как минимум одной единицы pH в обе стороны от pKa». В этой связи верхнее значение pH должно быть 8.8, а не 8.14.

В работе отмечено заметное количество орфографических и грамматических ошибок, например:

С. 5, первый абзац - «в следствие утечки электронов», правильно - «вследствие утечки электронов»

С. 31, абзац об урацил-ДНК-гликозилазах - «не велика» , правильно - «невелика»

С. 35, первая строка - «ММотив» , правильно - «Мотив»

С. 36, подпись к рис. 12 - «струткур FoldMason» , правильно - «структур FoldMason»

С. 60, описание окисления тимина - «По окончанию реакции» , правильно - «По окончании реакции»

С. 70, §3.2.24 - «Рестрикция ферментом HindIII и лигирование выполнялась» , правильно - «Рестрикция ферментом HindIII и лигирование выполнялись»

С. 72, последний абзац - «был разработали подход» , правильно - «был разработан подход»

С. 94, второй абзац - «по-крайней мере отчасти» , правильно - «по крайней мере отчасти»

С. 125, абзац о петле LlaFpg - «Помимо этого, частота мутаций с мутантными вариантами в комплементационном тесте в штамме E. coli CC104 с делецией генов fpg и mutY не снижали частоту мутаций относительно делеционного штамма.», корректно будет -

«Помимо этого, мутантные варианты в комплементационном тесте в штамме E. coli CC104 с делецией генов fpg и mutY не снижали частоту мутаций относительно делеционного штамма.» и т.п.

Тем не менее указанные замечания не снижают научной ценности работы и не влияют на общее представление о качестве и обоснованности работы.

Заключение

Представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук диссертация Булгакова Никиты Алексеевича выполнена на высоком научном уровне и является завершенной научно-квалификационной работой. В диссертации решена важная задача по изучению физико-химических основ субстратной специфичности ДНК-гликозилаз суперсемейства H2tH, что вносит значительный вклад в развитие биохимии и молекулярной биологии.

Диссертационная работа Булгакова Н.А. полностью соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН, а её автор, Булгаков Никита Алексеевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 Биохимия.

Заведующий лабораторией химии протеолитических ферментов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук,
доктор химических наук,
член-корреспондент Российской академии наук,
E-mail: ivansmr@inbox.ru, телефон: +7 (495) 336-73-00

Смирнов Иван Витальевич

«11» ноября 2026

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН)
Адрес: 117997, г. Москва, вн. тер.г. муниципальный округ Коньково, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к. 1
Контактный телефон: +7 (495) 335-01-00, факс: +7 (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, адрес официального сайта: https://www.ibch.ru/