

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу М.А. Парсаданян “Взаимодействие различных лигандов с синтетическим полинуклеотидом poly(rA)-poly(rU)”, представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.02 – Биофизика, биоинформатика.

Исследования взаимодействий биологически активных низкомолекулярных соединений (лигандов) с нуклеиновыми кислотами начались во второй половине XX-го века и до настоящего времени являются одним из актуальных проблем молекулярной биофизики. В этой области проведен большой объем исследований, однако интерес к изучению взаимодействия лигандов с нуклеиновыми кислотами (НК) все еще не теряет актуальности в связи с разработкой дизайна лекарственных препаратов, а также биосенсоров и биочипов.

В последние десятилетия возрос интерес к биофизическим исследованиям процессов с участием РНК, особенно ее двухцепочечной формы, поскольку она играет ключевую роль в экспрессии генов. С этой точки зрения необходимо отметить, что при различных заболеваниях, таких, как болезнь Паркинсона, Альцгеймера и др., имеет место повреждение РНК. Являясь генетическим материалом ряда вирусов, РНК является ключевым активатором РНК-вирусных инфекций, которые могут вызывать острые респираторные заболевания. Различные микро-РНК могут вызывать в гомологичных последовательностях и-РНК деградации, что открывает новые возможности для исследования механизмов повреждения информационной и других видов РНК. Этим, в частности, обусловлено то, что в некоторых случаях РНК становится неспособной транслироваться в белок, поскольку образует двухцепочечные структуры с указанными выше микро-РНК: явление так называемой интерференции РНК.

Природные РНК в основном состоят из одной нити и могут принимать различные пространственные структуры, вплоть до третичной и четвертичной форм. Это ограничивает исследования по взаимодействию лигандов с дц-формой РНК. Однако, полиадениловая-полиуридиловая кислота - poly(A)-poly(U), в определенных условиях существует в дц-форме, что делает этот синтетический полинуклеотид хорошей моделью дц-РНК. В частности, метаболически стабильный двухцепочечный комплекс синтетических РНК poly(A)-poly(U) был использован для лечения рака груди.

В диссертационной работе М. Парсаданян в качестве лигандов, связывающихся с дц-РНК, были выбраны ДНК-специфические красители БЭ, МС и Hoechst 33258, первые два из которых являются интеркаляторами, Hoechst 33258 – желобковым лигандом. Выбор этих лигандов можно считать одним из преимуществ работы, поскольку полученные для

комплексов этих лигандов с poly(A)-poly(U) данные сравнивались с результатами их комплексов с дц-ДНК, которые изучены и теоретически, и экспериментально, и помогают выявить различные аспекты механизма воздействия низкомолекулярных соединений на генетический материал. В диссертационной работе проведено также теоретическое исследование кинетики взаимодействия лигандов-интеркаляторов с дц-НК.

Диссертационная работа М. Парсаданян состоит из введения и шести глав. Во введении обосновываются актуальность темы, цели и задачи исследования. В первой главе представлен литературный обзор, в котором приведены данные о структурах ДНК и РНК, а также по взаимодействию малых молекул с нуклеиновыми кислотами. Особое внимание уделено механизмам связывания лигандов, а также представлены данные о структуре и функциях, разработанных в последние два-три десятилетия биосенсоров и биочипов на основе нуклеиновых кислот. Представленные в этой главе данные являются достаточно информативными и являются той основой, на которой в дальнейшем было построено настоящее исследование.

Вторая глава посвящена исследованию кинетики связывания различных лигандов с ДНК. Разработан математический аппарат, описывающий различные степени заполнения центров адсорбции на ДНК, а также дисперсию связанных лигандов. Рассмотрены различные случаи, в том числе, кооперативное связывание. Также проанализирована работа биочипов и биосенсоров при гибридизации, в присутствии лигандов, с помощью разработанного математического аппарата и получены важные результаты, которые имеют фундаментальное значение в понимании механизмов их функционирования.

Далее, в третьей главе приведены результаты экспериментальных исследований по взаимодействию интеркалятора БЭ с синтетическим полинуклеотидом poly(rA)-poly(rU) в качестве модели дц-РНК. Осуществлено всестороннее исследование по взаимодействию этого лиганда с указанным полинуклеотидом спектроскопическими подходами, в частности: методами УФ-плавления, абсорбционной и флуориметрической спектроскопии. Применение этих методов позволило М.А. Парсаданян получить точные и достоверные данные. При этом, автором проводилось сравнение полученных результатов с аналогичными данными по взаимодействию БЭ с различными НК. Подобный сравнительный анализ позволил выявить, что poly(rA)-poly(rU) может находиться как в дц- так и в трехцепочечном и одноцепочечном состояниях в зависимости от ионной силы раствора и типа катионов. Автору удалось определить те условия раствора, в котором этот полинуклеотид находится только в дц-состоянии и, при структурных превращениях, из этого состояния переходит в оц-состояние при взаимодействии с БЭ. Автором также выявлено, что БЭ проявляет некоторую предпочтительность к poly(rA)-poly(rU), по

сравнению с poly(dA)-poly(dT) и ДНК. В ходе исследований проведен анализ изобестической точки, которая проявляется в большинстве случаев на спектрах поглощения комплексов ДНК с лигандами интеркаляторами. Показано, что спектры поглощения комплексов БЭ с ДНК при определенных концентрационных соотношениях пересекаются в одной точке. Ее можно определить также с помощью статистической обработки спектров поглощения, для уточнения достоверности ее существования. На основании спектральных исследований автором оценены термодинамические параметры связывания БЭ с poly(rA)-poly(rU).

Таким образом, можно сказать, что в данной главе определены фундаментальные термодинамические параметры, которые получены впервые. Несомненно, они могут стать основой для дальнейших исследований в этой области.

В четвертой главе представлены данные по взаимодействию неклассического интеркалятора МС с poly(rA)-poly(rU). Ценность этих исследований заключается в том, что МС, а также желобковое соединение Hoechst 33258, также изученное в диссертационной работе, являются не только лигандами, но и имеют прикладное значение, поскольку получили применение в медицине в качестве лекарственных препаратов. Общие результаты, полученные автором, следующие: при полуинтеркаляционном способе связывания МС не вызывает структурных изменений полинуклеотида, в то время как классический интеркалятор БЭ существенно влияет на дц-структуру НК. Другой важный результат то, что МС с дц-НК связывается посредством полуинтеркаляции, при этом, однако, сродство этого лиганда к poly(dA)-poly(dT) меньше, чем к более гибкой А- форме (РНК) При этом, полуинтеркаляция МС может иметь место как со стороны большого, так и малого желобка ДНК, что может быть причиной кажущегося желобкового связывания этого лиганда с НК. Автором также показано, что дц-структура poly(rA)-poly(rU), с которой МС связывается по механизму как полуинтеркаляции, так и полной интеркаляции, при относительно низких ионных силах нестабильна, в то время как сродство данного лиганда к стабильной дц-структуре poly(rA)-poly(rU) и ДНК уменьшается при относительно больших ионных силах в результате перехода структуры НК в более плотноупакованное состояние и становится недоступной для интеркаляции тиозинового красителя. Полученные данные представляют новизну и, вкуче с другими результатами диссертационной работы М. Парсаданян, имеют важное фундаментальное значение.

В пятой главе автором представлены данные по взаимодействию различных НК с желобковым лигандом Н33258. Из полученных данных следует, что Н33258, при взаимодействии с ДНК, предпочтительнее связывается в ее малом желобке, с ярко

выраженной АТ-специфичностью и интеркаляцией с GC-богатыми участками. При связывании же с poly(dA)-poly(dT) и poly(rA)-poly(rU), при определенных концентрациях этот лиганд вызывает дуплекс-триплексный структурный переход, который более выражен в случае В-формы нуклеиновой кислоты и не зависит от ионной силы раствора, в то время как при А-форме НК этот эффект проявляется при низких ионных силах раствора, при относительной нестабильности дц-структуры. Важно отметить, что увеличение ионной силы раствора вызывает стабилизацию дц-структуры poly(rA)-poly(rU), вследствие чего дуплекс-триплексный переход прекращается.

При этом, полный термодинамический анализ комплексообразования нетропсина и Н33258 с двухцепочечной РНК показывает, что оба лиганда предпочтительнее связываются с АТ (АУ) парами схожим механизмом. Однако, в случае нетропсина это взаимодействие сопровождается отрицательным изменением энтальпии, в то время как в случае Н33258 – положительным. При этом, вклад энтропийного фактора в образование комплексов более выражен в случае Н33258, что, по всей вероятности, имеет компенсирующее значение для стабилизации комплексов.

Обобщая полученные данные, автор заключает, что дц-РНК в равной мере, как и ДНК, может взаимодействовать с многочисленными лигандами, специфичными к ДНК. Более того, в некоторых случаях дц-РНК может служить более предпочтительной мишенью для различных лигандов, в том числе, лекарственных препаратов, что открывает новые возможности для модуляции клеточных процессов с помощью различных биологически активных соединений.

Довольно необычен формат, когда использованные в работе методы исследований вынесены в конец диссертации в качестве шестой главы. К тому же описания классической части некоторых исследований излишне подробны, учитывая, что формат докторской диссертации нацелен в основном на узкоспециализированную научную аудиторию. Возможно такой подход оправдан тем, что данные методики приведены с модификациями, и подробное описание было необходимо для разъяснения сути данных модификаций, а также методов оцифровки, на уровне молекулярных механизмов. В любом случае, адекватность этих методов для приведенных исследований, а также их точность и чувствительность не вызывают сомнений и являются гарантом достоверности полученных данных.

Основные статьи, приведенные в автореферате, опубликованы в зарубежных реферируемых журналах, что указывает на высокую специализацию автора в прорабатываемой ею области научных проблем.

В заключительной части диссертационной работы автором обобщены полученные данные и на их основании сформулированы выводы, которые полностью отражают результаты исследований.

Автореферат также полностью отражает содержание диссертационной работы.

Однако, у меня есть вопросы к диссертанту:

1. Есть ли разница в локализации H33258 в малом желобке дц-ДНК и дц-РНК?
2. Было бы желательно, чтобы в работе проводились исследования связывания этих лигандов с одно-цепочечными РНК, что важно при их взаимодействии с лекарственными препаратами *in vivo*. Есть ли подобные исследования в литературе?

Диссертационная работа выполнена на высоком профессиональном уровне, хотя и не лишена технических недостатков, которые однако никоим образом не унижают ценность и значимость диссертационной работы М. Парсаданян. Данное многолетнее исследование диссертанта по теме “Взаимодействие различных лигандов с синтетическим полинуклеотидом poly(rA)-poly(rU)” вносит существенный вклад в область актуальных исследований взаимодействий низкомолекулярных соединений с нуклеиновыми кислотами; полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, а автор несомненно заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.02 – “Биофизика, биоинформатика”.

Доктор биол.наук
Директор Института физиологии
им. акад.Л.А. Орбели НАН РА

Подпись д.б.н. Н.М.Айвазян заверяю,
Ученый секретарь Еганова В.С.



Н.М.Айвазян

15.11.2021 г.