

"УТВЕРЖДАЮ"

Директор института физики им. Е. Андроникашвили,
Доктор физико-математических наук

Гелашвили. Г. В.

дата 05.11.2021



ОТЗЫВ

Ведущей организации Института Физики им. Е. Андроникашвили ТГУ

г. Тбилиси На диссертационную работу М.А. Парсадаян

“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

Диссертационная работа М.А. Парсадаян посвящена особенностям взаимодействия некоторых лигандов с poly(rA)-poly(rU), являющейся моделью дц-РНК. Интерес к изучению структурных и функциональных свойств РНК в настоящее время возрос в связи с тем, что она, вкупе с ДНК играет важную роль в процессах, обеспечивающих жизнедеятельность клетки. Особый успех зарегистрировался в последние десятилетия, поскольку были обнаружены многочисленные патологические процессы, обусловленные РНК содержащими вирусами или клеточными РНК.

Двухцепочечная форма РНК зачастую является первичной мишенью для многих биологически активных соединений, в том числе и для тех, которые непосредственно связываются с ДНК (ДНК-специфические лиганды). В этом аспекте исследования по взаимодействию таких лигандов с дц-структурой РНК могут стать значимыми и с фундаментальной научной, и с практической точки зрения.

Выяснение специфичности биологически активных соединений к той или иной конформации НК становится весьма существенным. Эти проблемы всегда находятся в сфере современных биофизических интересов и этим вопросам посвящена докторская работа М.А. Парсадаян. В ней приведены экспериментальные данные, имеющие научную ценность, а полученные теоретические и экспериментальные результаты позволят выявить некоторые

глубинные свойства лигандов и НК, при взаимодействии которых на молекулярном уровне выявляется свойственная им биологическая активность.

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, списка литературы, насчитывающего 328 наименований.

Во введении автор обосновал актуальность темы, сформулировал цель диссертационной работы, научную новизну и практическое значение, а также представил основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе приведены литературные данные о структуре и роли различных видов РНК, а также о механизмах обратимого связывания лигандов с НК. Представлены современные данные об интеркаляционном и желобковом связывании лигандов с ДНК, а также некоторые сведения о биочипах и биосенсорах, работающих на основе взаимодействия ДНК и лигандов-интеркаляторов.

Во второй главе проведено исследование кинетики взаимодействия лигандов с НК, в которой связывание лиганда с НК описывается в рамках теории случайных процессов. Благодаря этому автору удалось показать, что вероятностное описание взаимодействия лиганда с НК позволяет описать кинетику изменения числа связанных с НК малых молекул при произвольном заполнении и вычислить стационарные значения числа связанных с НК лигандов и его дисперсию. Эти исследования имеют не только фундаментальное, но и прикладное значение в связи с тем, что в настоящее время широкое применение получили геносенсоры и геночипы, в основе работы которых лежит гибридизация одиночных нитей с образованием дуплексов, а также взаимодействие НК с лигандами. Одним из важных результатов работы является то, что получена система дифференциальных уравнений, которая описывает согласованное изменение числа ДНК-дуплексов на подложке (геночипах) и изменение числа лигандов, интеркалированных в ДНК-дуплексы. При этом показано, что скорость заполнения подложки ДНК-дуплексами увеличивается с ростом, как константы равновесия реакции образования ДНК-дуплексов, так и концентрации мишеней ДНК в растворе, поскольку кинетика интеркаляции лигандов в ДНК-дуплексы существенным образом зависит от соотношения констант скорости диссоциации ДНК-дуплекса и скорости диссоциации комплекса лиганда с ДНК-дуплексом.

Вышеприведенное относится также к дц-структуре РНК, которая играет существенную роль в экспрессии генов, а также в жизненном цикле клетки. В качестве модели дц-РНК была выбрана poly(rA)-poly(rU) и, как показывают результаты исследования, в интервале изменения ионной силы раствора $0.02 \leq \mu \leq 0.1$ М и в присутствии одновалентных

катионов этот полинуклеотид находится только в двухцепочечном (дц-) состоянии. С другой стороны в работе показано, что poly(rA)-poly(rU), имеет относительно нестабильную структуру при низких ионных силах раствора ($\mu < 0,04$ М), которая стабилизируется при увеличении ионной силы раствора. В частности, выявлено, что при концентрации одновалентного катиона Na^+ - 0,02 М, poly(rA)-poly(rU) имеет метастабильную дц-структуру, которая переходит в более стабильное дц-состояние с увеличением концентрации катионов. При этом, в условиях относительно низких ионных сил раствора ($\mu \leq 0,1$ М) poly(rA)-poly(rU) не переходит в трехцепочечное состояние, особенно в присутствии только одновалентных катионов или некоторых интеркаляторов, несмотря на то, большинство интеркалирующих лигандов могут инициировать такой переход.

В третьей главе приведены экспериментальные результаты по взаимодействию классического интеркалятора бромистого этидия с poly(rA)-poly(rU). Полученные данные указывают, что в дц- состоянии этот полинуклеотид может с высоким сродством взаимодействовать с дц-ДНК специфическими лигандами. Это позволило автору справедливо полагать, что дц-структура НК является основной мишенью для большинства лигандов. Более того, результаты данного исследования показывают, что классический интеркалятор и мультимодальный лиганд БЭ с различными формами дц-НК связывается одними и теми же механизмами, а именно, интеркаляционным, полуинтеркаляционным, электростатическим. При этом выявлено, что, несмотря на схожесть механизмов связывания БЭ с дц-ДНК и poly(rA)-poly(rU), тем не менее, этот лиганд проявляет предпочтительность к А-форме НК, по сравнению с В-формой. На основании полученных данных было обнаружено, что стабилизирующее влияние БЭ на дц-структуру НК меняется в следующем порядке: дц-ДНК < дц-poly(dA)-poly(dT) < дц-poly(rA)-poly(rU). Очевидно, что механизмы связывания БЭ с НК фактически не зависят от ионной силы раствора, от конформационной формы нуклеиновой кислоты и от нуклеотидного содержания последней.

В работе предложен новый метод анализа изобестической точки (ИТ). ИТ – длина волны, при которой два соединения способные превращаться друг в друга, имеют одинаковую поглощательную способность. Она является важным критерием, который может проявляться в спектрах поглощения различных соединений при химических превращениях или при взаимодействии с другими молекулами. Так, в случае некоторых интеркаляторов, таких, как БЭ, профлавин, актиномицин Д и др., в спектрах поглощения образуется ИТ, которая ранее считалась критерием интеркаляционного способа связывания этих лигандов с дц-ДНК.

В четвертой главе проведены исследования по взаимодействию другого интеркалятора, метиленового синего (МС) с poly(dA)-poly(dT), а также с poly(dA)-poly(dT). Полученные результаты указывают на то, что структура указанных полинуклеотидов при полуинтеркаляционном способе связывания МС не претерпевает существенных изменений, как в случае полной интеркаляции БЭ. При этом обнаружено, что сродство МС к poly(dA)-poly(dT) (жесткая В-форма НК) меньше, чем к более гибкой poly(rA)-poly(rU) (А-форма) или ДНК (более гибкая В-форма), а полуинтеркаляция МС может иметь место как со стороны большого, так и малого желобка (богатого АТ последовательностями) ДНК, что может быть причиной кажущегося желобкового связывания этого лиганда с НК. Как показывают результаты диссертационной работы М. Парсадзян, МС связывается с метастабильной дц-структурой poly(rA)-poly(rU) по механизму как полуинтеркаляции, так и полной интеркаляции, в то время как сродство этого лиганда к стабильной дц-структуре poly(rA)-poly(rU) и ДНК уменьшается при относительно больших ионных силах, что обусловлено тем, что структура НК переходит в более упакованное состояние и становится недоступной для интеркаляции тиозинового красителя МС.

В пятой главе проведены сравнительные исследования по взаимодействию желобкового лиганда Hoechst 33258 (Н33258) с poly(rA)-poly(rU), а также с poly(dA)-poly(dT) и ДНК. При взаимодействии с ДНК, Н33258 связывается в ее малом желобке, с ярко выраженной АТ-специфичностью и интеркаляцией в GC-богатые участки. При связывании же с poly(dA)-poly(dT) и poly(rA)-poly(rU) специфичность к определенным парам отсутствует, вследствие чего, при определенных концентрациях этот лиганд вызывает дуплекс-триплексный структурный переход. Этот эффект Н33258 на структуру указанных полинуклеотидов более выражен в случае В-формы НК и не зависит от ионной силы раствора, а в случае А-формы этот эффект проявляется при низких ионных силах раствора, при относительной нестабильности дц-структуры. С увеличением ионной силы раствора выше 0,2 М, дц-структура А-формы НК стабилизируется и дуплекс-триплексный переход не проявляется.

Автором проведен полный термодинамический анализ комплексообразования желобковых лигандов нетропсина и Hoechst с двухцепочечной РНК, сравнением результатов которого выявлено, что, оба лиганда связываются с АТ (АУ) парами практически одинаковым механизмом, однако в случае нетропсина это взаимодействие сопровождается отрицательным изменением энтальпии, в то время как в случае Hoechst – положительным, при этом, вклад энтропийного фактора в образовании комплексов более выражен в случае

Hochst, что, по всей вероятности, имеет компенсирующее значение для стабилизации комплексов. Полученные данные указывают на то, что дц-РНК также может служить первичной мишенью для многочисленных лигандов. Этот результат является важным, поскольку открывает новые возможности для модуляции клеточных процессов с помощью различных биологически активных соединений.

В шестой главе приведены материалы и методы исследования. Примененные методы несомненно являются наиболее подходящими для осуществления поставленных задач в рамках данного исследования. На основании примененных экспериментальных и теоретических методов исследования получены данные, точность которых не оставляет никакого сомнения.

Результаты работы докладывались и обсуждались на различных международных и республиканских научных конференциях и отражены в 37 научных публикациях, которые полностью соответствуют содержанию диссертации и включены в работу. Автореферат полностью отражает содержание диссертации, выводы исходят из результатов диссертации.

Диссертационная работа М.А. Парсаданян сформулирована на высоком научном уровне, четко иллюстрирована рисунками и графиками.

Как пожелания хотелось также отметить следующее:

1. Для полноценного анализа желательно было бы провести исследования по взаимодействию указанных лигандов и с природной РНК, поскольку синтетический полинуклеотид poly(rA)-poly(rU) тем не менее, не может полностью отражать ее структурно-функциональные особенности;
2. Желательно было бы рассмотреть роль "spine of water", которая образована в минорном желобке poly(dA)-poly(dT) в сворачивании и стабилизации poly(dA)-poly(dT) и других ДНК дуплексов с АТ обогащенными участками;
3. Было бы желательным также в числе спектральных методов применить КД спектроскопию, которая является достаточно информативной в подобных исследованиях.

Несмотря на вышеуказанные замечания, М.А. Парсаданян проведена работа большого объема. Ей удалось получить интересные результаты, которые вносят значительный вклад в данной области науки.

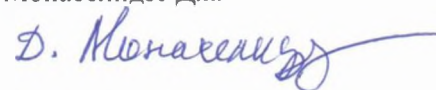
Диссертационная работа М.А. Парсаданян по теме "Взаимодействие различных лигандов с синтетическим полинуклеотидом poly(rA)-poly(rU)" полностью соответствует

требованиям, предъявленным к докторским диссертациям, а автор работы заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.02 – Биофизика, биоинформатика.

Отзыв ведущей организации о научно-практической ценности диссертации М.А. Парсаданян на тему “Взаимодействие различных лигандов с синтетическим полинуклеотидом poly(rA)-poly(rU)” обсужден на заседании научного семинара отдела Физики Биологических Систем института Физики им. Е.Л. Андроникашвили Тбилисского гос. университета 04 ноября 2021 года (Протокол N10 от 04. 10. 2021г).

Зав. отделом Физики Биологических Систем,
главный научный сотрудник,
доктор физико-математических наук
Института Физики им. Е.Л. Андроникашвили
Тбилисский гос. Университет
ул. Тамарашвили 6, Тбилиси 0177, Грузия

Монаселидзе Дж.



Потпись доктора физико-математических наук
Д.Р.Монаселидзе заверяю:
Зам. отд. кадров.
Института Физики им. Е.Л. Андроникашвили
Тбилисский Гос. Университет
ул. Тамарашвили 6,
Тбилиси 0177
Грузия

Брегвадзе М.



04. 11. 2021



Протокол №10 заседания ученого совета отдела физики биологических систем института физики ТГУ 28/10/2021

На заседании заслушали работу Парсаданян Маринэ Ашотовны «Взаимодействие различных лигандов с синтетическим полинуклеотидом poly(rA)-poly(rU), представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.02-биофизика, биоинформатика, выполненную в Ереванском Государственном Университете.

Работа направлена в Института Физики ТГУ как в ведущую организацию по оценке данной диссертационной работы.

Доклад М. Парсаданян вызвал общий интерес в связи с новейшими экспериментальными данными касающийся выявления новых тонких механизмов взаимодействия биологически важных интерколяторов-лигандов: бромистого этидия (БЭ), Метилового синего (МС) и желобковосвязывающегося соединения H33258 с нуклеиновыми кислотами, включая синтетический полинуклеотид poly(rA)-poly(rU) являющейся моделью двухцепочной РНК, сравнительное исследование взаимодействия H33258 с poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT), как новый шаг более глубокого понимания физико-химических механизмов связывания лекарственных препаратов с различными дц структурами РНК и применение различных веществ в технологиях геносенсоров и геночипов.

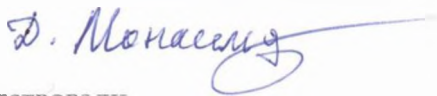
Диссертанту было заданно множество вопросов о выборе полинуклеотидов, концентрации лиганда и полимера, об их перераспределении вдоль полимера при нагреве а также, роль структурной воды в стабилизации poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT) и их комплексов с интерколяторами. Ответы были убедительные, правильные и интересные для присутствующих ученых.

Высказанно общее мнение что работа удовлетворяет все требования представленные к докторским диссертациям в области специальности 03.00.02-биофизика, биоинформатика.

Института физики ТГУ, берет на себя обязанность выступить в роли ведущей организации.

Председатель научного совета, главный научный сотрудник, заведующий отделом физики биологических систем, доктор физико-математических наук

Дж. Монаселидзе



На заседании присутствовали

Главные научные сотрудники: Дж. Монаселидзе, В. Брегадзе доктора физ.мат наук, Н. Сапожникова доктор биол. наук.

Старшие научные сотрудники: М. Абуладзе, доктор биол. наук, Т Картвелишвили доктор биол. наук, Н. Асатиани и М. Киладзе доктора хим. наук, Е. Кизирия, В Сохадзе, Ш. Гогичаишвили, М. Горгошидзе, Э. Гелагуташвили доктора физ. мат наук и другие научные сотрудники.