

О Т З Ы В

**официального оппонента на диссертационную работу
М. А. Парсаданян по теме «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»**

Интерес к вопросу изучения структуры, функций нуклеиновых кислот (НК) и их особенностей связывания с низко- и высокомолекулярными молекулами продолжает расти и по сей день. Эти исследования являются важными как с точки зрения физики нуклеиновых кислот (ДНК представляет из себя одномерный аperiодический кристалл), так и с точки зрения ее биологической значимости (именно аperiодичностью последовательности нуклеотидов и определяется его способность сохранения и передачи генетической информации). Таким образом, прикладная значимость работ, посвященных исследованиям строения и функциональной деятельности НК и ее комплексов с разными молекулами-лигандами очевидна.

В настоящее время наступил новый этап подобных исследований. Это во многом обусловлено развитием и перспективами прикладного значения этих взаимодействий в сфере медицинской диагностики. С помощью так называемых биосенсоров на основе НК проводятся, и в будущем будут проводиться, ряд важнейших тестов для диагностики таких разнообразных и угрожающих жизни человека болезней как онкозаболевания, аутоиммунные заболевания, диабет и т.д. В биосенсорах на основе НК, взаимодействия НК-лиганд имеют важное значение для модуляции получаемых сигналов. На сегодняшний день этот факт и является триггером в исследованиях взаимодействий НК-лиганд.

Следует отметить, что на фоне большого количества работ по изучению ДНК и ДНК-лиганд комплексов, структуры и свойства РНК и ее комплексов с лигандами мало изучены. Вместе с этим, надо отметить, что в технике по приготовлению биосенсоров РНК также полноценно применяются и образование РНК-ДНК гибридов, что дает точную информацию о гибридизации (как и в случае ДНК-ДНК гибридизации). С научно-прикладной точки зрения, работы по

исследованиям особенностей взаимодействия различных лигандов с РНК и их сравнение с данными ДНК-лиганд комплексов являются очень актуальными и ценными работами.

В диссертационной работе М.А. Парсадзян исследовано связывание классического интеркалятора бромистого этидия (БЭ), интеркалятора метиленового синего (МС) и желобковосвязывающегося соединения Hoechst 33258 (Н33258) с нуклеиновыми кислотами (НК), в частности с poly(rA)-poly(rU), как модель двухцепочечной РНК, а также изучены термодинамические свойства комплексов НК с отмеченными лигандами. Стоит отметить, что РНК в разных участках, в различных фазах клеточного цикла может принимать двухцепочечную структуру, что имеет особо важное значение для жизнедеятельности клетки.

С другой стороны, в биосенсорных устройствах широко используются гибриды РНК, когда тестируемым материалом является РНК. С этой точки зрения, исследования двухцепочечной РНК являются актуальными, с учетом того, что проводились исследования поведения РНК в окружении лигандов. Вышеотмеченные лиганды являются ДНК-специфическими, и существует множество работ по взаимодействию этих лигандов с ДНК. Этот факт используется в работе при сравнении с особенностями взаимодействия двухцепочечной РНК с лигандами. Стоит также отметить, что исследования НК-лиганд являются ценными не только с точки зрения их применения в биосенсорных технологиях, но и с точки зрения поиска эффективных потенциальных лекарственных препаратов, которые будут взаимодействовать не только на уровне ДНК, но и РНК.

Диссертационная работа М.А. Парсадзян состоит из введения, шести глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, насчитывающего 328 наименований оригинальных публикаций. Диссертация изложена на 256 страницах, включает 55 рисунков и 11 таблиц.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, приведены практическое и научное значения, а также основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена литературному обзору. В этой главе описаны современные представления о структуре и функций НК, а также основные молекулярные механизмы связывания лигандов с НК. Проведен также анализ

современной литературы о строении и механизмах работы биосенсоров, в частности, особое внимание уделено биосенсорам на основе РНК, описаны особенности сложностей применения РНК в биосенсорных технологиях и современные достижения в этой области.

Во второй главе диссертационной работы М.А. Парсадзян приводится анализ кинетики взаимодействия лигандов с НК. Рассчитаны кинетические параметры как некооперативного, так и кооперативного связывания вышеотмеченных лигандов с НК. Исследуются также кинетические аспекты работы ДНК-биосенсоров и ДНК-чипов. Получена система дифференциальных уравнений, которая описывает изменение числа ДНК-дуплексов на подложке и изменение числа лигандов, интеркалированных в ДНК-дуплексы. Показано, что скорость заполнения подложки ДНК-дуплексами увеличивается с ростом как константы равновесия реакции образования ДНК-дуплексов, так и концентрации мишеней ДНК в растворе.

Третья, четвертая и пятая главы диссертационной работы М.А. Парсадзян посвящены экспериментальному исследованию БЭ, МС и H33258 с poly(rA)-poly(rU) соответственно.

Одним из важных результатов данной работы является то, что при исследовании каждого из этих лигандов с poly(rA)-poly(rU) проводится **сравнение полученных результатов с таковыми связывания этих лигандов с ДНК**, что очень важно с точки зрения выявления различий особенностей взаимодействия с двухцепочечной ДНК и двухцепочечной РНК. В работе использованы современные экспериментальные методы – абсорбционная, флуоресцентная спектроскопии, а также метод УФ-плавления. При исследованиях poly(rA)-poly(rU) с лигандами, данные сравниваются с таковыми их связывания с poly(dA)-poly(dT), что также является важной стороной работы. Показано, что poly(rA)-poly(rU) в определенном интервале изменения ионной силы раствора находится в двухцепочечном состоянии, при этом, стабильность структуры увеличивается с ростом ионной силы раствора, в то время как при низких значениях ионной силы poly(rA)-poly(rU) переходит в трехцепочечное состояние. Двухцепочечная poly(rA)-poly(rU) с высоким сродством связывается с ДНК-специфическими лигандами.

В случае БЭ (казалось бы, этот лиганд досконально исследован на протяжении многих лет) показано, что этот лиганд проявляет большее сродство к А-формам НК, по сравнению с В-формами, при этом имея стабилизирующий эффект на НК. Этот эффект наиболее выражен в случае связывания с ДНК, затем poly(dA)-poly(dT) и наименьшее выражение находит при связывании с poly(rA)-poly(rU). В случае же взаимодействия МС с НК выявлено, что МС с большим сродством полуинтеркалирует в poly(dA)-poly(dT), чем в poly(rA)-poly(rU), однако с метастабильной формой poly(rA)-poly(rU) МС взаимодействует еще и способом интеркаляции. Особенно интересным являются данные по взаимодействию H33258 с poly(dA)-poly(dT) и poly(rA)-poly(rU). Из полученных результатов в диссертационной работе видно, что при определенных концентрациях лиганда происходит дуплекс-триплексный структурный переход, который выражен более ярко для poly(dA)-poly(dT) и с меньшим проявлением – для А-формы, при этом с увеличением ионной силы раствора двухцепочечная структура poly(rA)-poly(rU) стабилизируется и вышеотмеченный переход прекращается.

Из полученных экспериментальных данных выявляется также научно-прикладное значение исследований, а именно, становится понятным, что в некоторых случаях РНК является более перспективной и предпочтительной мишенью для связывания лигандов. Это открывает новые возможности применения РНК в биосенсорных технологиях, в разработке мишеней для различных лекарственных препаратов и в других важнейших сферах биомедицины и диагностики.

Подытожив вышесказанное, приходим к выводу, что диссертационная работа М.А. Парсаданян выполнена на высоком научном уровне, цели и задачи работы поставлены достаточно четко, апробация результатов прошла на достаточно высоком уровне.

Однако, как часто бывает при столь объемных исследованиях, диссертация не лишена также некоторых недостатков. В частности:

- на стр. 7 в разделе «Научная новизна и практическая значимость диссертационной работы» автор пишет: «выявлено, что на особенности взаимодействия лигандов различной природы влияют ионная сила раствора,

конформационное состояние нуклеиновых кислот». Это утверждение давно известно. Думаю корректнее было бы написать: «в случае использованных нами лигандов, как и следовало ожидать, особенности взаимодействия лигандов» (далее по тексту).

- на стр. 18 в параграфе 1.2 , где приводятся молекулярные механизмы связывания лигандов с НК, ковалентно связывающиеся молекула цис-Рt с НК рассматривается как лиганд, что, на мой взгляд, неверное утверждение, поскольку ковалентная сшивка молекулы с НК приводит к необратимому изменению самой структуры НК, следствием чего является изменение объекта исследования в целом;
- в работе рассмотрен случай кинетики связывания одного типа лигандов с НК. Было бы интереснее рассмотреть более общий случай кинетики связывания различных типов лигандов с НК;
- в работе исследование комплексов лигандов с poly(rA)-poly(rU) проводилось при относительно высоких ионных силах раствора, в то время как большинство данных по комплексам ДНК-лиганд получены при более низких ионных силах раствора. Чем Вы объясните это, исходя из того, что в некоторых случаях проводится сравнение этих результатов?

Указанные, на мой взгляд, недостатки, не уменьшают ценность данной диссертационной работы.

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что диссертационная работа вносит важную научную информацию, которая относится к особенностям взаимодействия ДНК-специфических лигандов с моделью двухцепочечной РНК – poly(dA)-poly(dT). Результаты исследований автора докладывались на многих международных 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. Экспериментально полученные в данном исследовании данные являются важными и актуальными, поскольку они могут послужить основой для применения в биосенсорных технологиях.

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

является серьезным исследованием, имеющим как теоретическое, так и экспериментальное значение и удовлетворяет требованиям, предъявленным к докторским диссертациям. Считаю, что автор работы заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности «Биофизика, биоинформатика».

Советник директора Института,
доктор физ.-мат. наук, профессор



С. Г. Арутюнян

Подпись профессора С. Г. Арутюняна заверяю:

Ученый секретарь Института,
кандидат физ.-мат. наук



С. Н. Неделько

15.11.2021г.