

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу М.А. Парсадзян 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»

Исследование связывания различных молекул с нуклеиновыми кислотами (НК), является важной проблемой современной молекулярной биофизики и биологии в целом. НК окружены многочисленными малыми и большими молекулами, которые, связываясь с ними, влияют на их структуру и функции. Взаимодействие низкомолекулярных соединений с ДНК может иметь важное значение для разработки потенциальных лекарственных препаратов, поэтому в течение многих десятилетий этот вопрос подробно исследуется. Интерес обусловлен тем, что связывание различных лигандов с ДНК приводит к изменению свойств ее определенных участков: к инактивации, или к активации генов. Этот факт, сам по себе, может использоваться для профилактики многих заболеваний, таких, как новообразования, гормональные и ауто-иммунные нарушения и т.д. Таким образом, взаимодействие лигандов с ДНК важно с точки зрения разработки лекарственных препаратов, которые смогут ингибировать возникновение заболевания на уровне ДНК. С другой стороны, лиганды могут взаимодействовать и со всеми формами РНК. Этот вопрос также имеет большую значимость, поскольку может изменить или же полностью ингибировать процесс синтеза белка уже в цитоплазме, не проникая в ядро. Кроме того, РНК является более доступным объектом для связывания с лигандами, чем ДНК в ядре, в упакованном виде. Из сказанного можно предположить, что РНК может быть более эффективной мишенью для связывания лигандов, чем ДНК. Однако стоит отметить, что этот вопрос не изучен достаточно подробно, поэтому исследования, посвященные проблеме взаимодействия лигандов с РНК, являются крайне актуальными.

С другой стороны, актуальность исследований взаимодействий лиганд-РНК это усилия по разработке биосенсоров, поскольку предполагается, что лиганд может модулировать сигнал биосенсора. Решение этого вопроса может иметь большие перспективы в сфере диагностики ряда заболеваний. В связи с данной проблемой нужно отметить, что в перспективе создания РНК-биосенсоров, важна РНК, поскольку по сравнению с геном, количество РНК в клетке больше. Поэтому необходимо разрабатывать методы по созданию РНК-биосенсоров. Однако, тут технология сталкивается с трудностями по приготовлению РНК-биосенсоров, подробно описанными в первой главе диссертационной работы. Важно отметить, что молекула РНК, являясь мишенью для вездесущих РНКаз крайне неустойчива. Действительно, нативная РНК в большинстве случаев одноцепочечная и вне клетки чрезвычайно лабильна. Нужно иметь ввиду, что, в клетке, РНК может принимать двухцепочечную структуру. Поэтому помимо одноцепочечной РНК, важно рассмотреть и ее двухцепочечный вариант как мишень для лигандов.

В диссертационной работе М.А. Парсаданян как модель двухцепочечной РНК использовался синтетический полинуклеотид – poly(rA)-poly(rU), а в качестве лигандов выбраны ДНК-специфические соединения, связывание которых с ДНК изучено достаточно хорошо.

Таким образом, работа, в целом, посвящена связыванию ДНК-специфических лигандов – классического интеркалятора бромистого этидия (БЭ), интеркалятора метиленового синего (МС) и желобковосвязывающегося соединения Hoechst 33258 (H33258) с poly(rA)-poly(rU). В работе изучены термодинамические свойства образующихся комплексов. Помимо исследований комплексов poly(rA)-poly(rU)-лиганд проведен сравнительный анализ связывания данных лигандов с ДНК, а также синтетическим полинуклеотидом – poly(dA)-poly(dT). Это сравнение очень важно с точки зрения выявления сходства и различий механизмов связывания лигандов с полирибонуклеотидными и полидезоксирибонуклеотидными последовательностями.

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

Во введении обоснована актуальность темы, изложены цель и задачи диссертационной работы, приведены практическое и фундаментальное значение, а также основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава - литературный обзор. Здесь представлены структурные особенности НК и механизмы их взаимодействия с лигандами. Приведена также общая характеристика биосенсоров – типы, механизмы работы, различные виды. Особое внимание обращено на трудности приготовления биосенсоров на основе РНК, представлены проблемы, связанные с созданием и функционированием биосенсоров.

Вторая глава диссертационной работы М.А. Парсаданян посвящена анализу кинетики взаимодействия лигандов с НК. Определены кинетические параметры связывания вышеотмеченных лигандов с синтетическим полинуклеотидом. При этом, изучена кинетика изменения числа связанных лигандов с НК при произвольном заполнении, и вычислены стационарные значения числа связанных лигандов и их дисперсии. Определены также константы скоростей образования и диссоциации комплексов лигандов с НК. Получена система дифференциальных уравнений, которая описывает изменение числа ДНК-дуплексов на подложке и лигандов, интеркалированных в ДНК дуплексы.

Третья глава посвящена экспериментальному исследованию бромистого этидия с poly(rA)-poly(rU), ДНК и poly(dA)-poly(dT). На основе данных, полученных в работе, выявляется, что при определенном значении ионной силы раствора poly(rA)-poly(rU) находится в двухцепочечном состоянии, при увеличении ионной силы это состояние стабилизируется, при этом, не наблюдается переход в трех-цепочечное состояние. Выявлено, что в двухцепочечном виде этот полинуклеотид обладает выраженным сродством к ДНК-специфическим лигандам.

Показано, что бромистый этидий связывается с двухцепочечными НК по тем же механизмам, однако различно сродство взаимодействия – оно более выражено по отношению к А-формам, чем к В-формам. Механизмы связывания бромистого этидия фактически не зависят от ионной силы раствора и от нуклеотидного содержания НК, а зависит только от формы НК.

Четвертая глава посвящена экспериментальному изучению метиленового синего с poly(rA)-poly(rU), ДНК и poly(dA)-poly(dI). Выявлено, что полуинтеркаляция МС в poly(rA)-poly(rU) может иметь место как со стороны большого, так и со стороны малого желобка, что, в свою очередь, предполагает желобковое связывание. Показано также, что с метастабильной структурой poly(rA)-poly(rU) МС, кроме полуинтеркаляции, связывается и по интеркаляционному способу, которая при относительно больших ионных силах не проявляется, поскольку структура НК переходит в более плотноупакованное состояние и становится недоступной для МС.

Пятая глава диссертационной работы М.А. Парсадзян посвящена экспериментальному исследованию Hoechst 33258 с poly(rA)-poly(rU), ДНК и poly(dA)-poly(dI). Из полученных данных по связыванию Hoechst 33258 с poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dI) выявлено, что лиганд вызывает дуплекс-триплексный структурный переход, что более выражен для В-формы. В случае poly(rA)-poly(rU), т.е. для А-формы данный переход наблюдается при низких ионных силах раствора, тогда как при высоких ионных силах полинуклеотид становится стабильным и переход дуплекс-триплекс прекращается.

В диссертационной работе М.А. Парсадзян проведен также сравнительный анализ связывания Hoechst 33258 и нетропсина с двухцепочечным РНК. Результатами анализа показано, что взаимодействие РНК с нетропсином сопровождается отрицательным изменением энтальпии, в то время как с Hoechst 33258 – положительным.

Таким образом, основываясь на полученных в работе конкретных результатах показано, что РНК, как и ДНК может взаимодействовать со многими лигандами. Это могут быть лиганды специфические для ДНК, что открывает новые возможности в сфере исследований связывания

потенциальных лекарственных препаратов, с РНК в первую очередь. Это также важно с точки зрения фармакодинамики лекарственных препаратов.

В шестой главе подробно описаны материалы и методы, использованные в диссертационной работе, использовался ряд биофизических методов, адекватных поставленным задачам – абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия, а также метод УФ-температурной денатурации. Считаю, что дизайн проведенных экспериментов и полученные результаты не вызывают никаких сомнений.

В целом, диссертационная работа М.А. Парсадзян выполнена на высоко профессиональном уровне. Результаты исследований докладывались на международных и местных научных конференциях и отражены в 25 научных статьях и 12 тезисах, которые полностью соответствуют содержанию диссертации и включены в работу. Автореферат также полностью отражает содержание диссертации, выводы исходят из полученных результатов. Однако, в связи с работой у меня есть некоторые вопросы:

1. Во второй главе рассмотрен случай интеркаляции лиганда в НК. Было бы интересно посмотреть, как будут себя вести лиганды, связывающиеся в малом желобке при этих же условиях исследования. Было бы также интересно исследовать случай гибридизации одноцепочечных полинуклеотидов, согласно схеме технологий по приготовлению биосенсоров.
2. Второй момент, даже не вопрос, а пожелание биолога: хотелось бы видеть детальное обсуждение возможного параллелизма между полученными *in vitro* результатами с процессами метаболизма, имеющими место в нативной и, скажем, малигнизированной или пораженной вирусом клетке.

В заключении, констатирую, что диссертационная работа М.А. Парсадзян является ценным исследованием и имеет несомненную научную значимость, в области взаимодействий ДНК-специфических лигандов с poly(rA)-poly(rU). Полученные данные могут быть использованы, в сфере разработки

потенциальных лекарственных препаратов, а также при создании новых НК-биосенсоров. Конечно одновременно мы должны помнить, что по современным оценкам большинство мишеней для лекарственных препаратов – белки и их комплексы.

Обобщая вышеуказанное приходим к однозначному выводу, что 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 практическое значение, удовлетворяет требованиям, предъявленным к докторским диссертациям, а автор работы заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности «Биофизика, биоинформатика».

Доктор биол. наук



К.Б. Назарян

Подпись К.Б. Назаряна заверяю
Ученый секретарь института молекулярной биологии
НАН РА, к.б.н.

9.11.2021г.



З.А.Хачатрян