

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Зварт Оганесовны Мовсисян “Изучение комплексообразования различных лигандов с синтетическими полирибонуклеотидами”, представленную на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 Биофизика, биоинформатика.

В жизнедеятельности клетки главную роль играют биомакромолекулы, особенно нуклеиновые кислоты, которые обеспечивают хранение и реализацию биологической информации. В процессе реализации этой информации активно участвует не только ДНК, но и РНК, внимание к которой в последние десятилетия возрастает в связи с появлением новых данных о ее значении. Однако, молекулярные механизмы регуляции экспрессии генов, опосредованные гомополинуклеотидными участками РНК, все еще не полностью изучены, несмотря на то, что эти последовательности могут проявить структурное разнообразие. Это позволит разработать соответствующие методы для выяснения механизмов регулирования процессов регуляции генной экспрессии.

ДНК-РНК-белок догма, которая является основной моделью экспрессии генов, предполагает, что синтетические соединения, которые связываются с РНК, должны модулировать продукцию белка. Поскольку экспрессия белка влияет на болезни, распознавание РНК может стать важным подходом к разработки различных лекарственных препаратов. Чтобы сделать концепцию еще более привлекательной, РНК можно применять для комплементарного спаривания с различными НК. Идентификация ведущего соединения, которое может связываться с РНК-мишенью с высоким сродством, может быть такой же простой, как разработка комплементарных олигонуклеотидов, с последующим рутинным синтезом и тестированием, что является также важным для понимания структурно-функциональных свойств нуклеиновых кислот в клетке.

Исследования по взаимодействию различных биологически активных соединений с макромолекулами (НК, белки) продолжают оставаться актуальными, несмотря на то, что эти системы являются объектом интенсивного исследования уже

несколько десятков лет. Среди различных биологически активных молекул важное значение имеют соединения, которые непосредственно могут связываться и с ДНК, и с РНК. В частности, специфические к двухцепочечной (дц-) структуре ДНК интеркалирующие лиганды могут стать хорошими объектами в исследованиях по выявлению структурно-функциональных особенностей оц-олиго- или полирибонуклеотидов, а также влияния лигандов на их гибридизацию с комплементарными цепями РНК, а также ДНК. Эти лиганды примечательны тем, что большинство из них являются классическими объектами для таких исследований.

В этой связи представленная диссертационная работа актуальна, поскольку данное исследование посвящено особенностям взаимодействия одноцепочечных (оц-) и двухцепочечных (дц-) синтетических полинуклеотидов, являющихся моделью в изучении комплексов оц- и дц-РНК с различными низкомолекулярными соединениями, разными спектральными методами. В работе в качестве моделей РНК служат оц-poly(rA) и poly(rU) и результат их гибридизации – дц-poly(rA)-poly(rU). Следует отметить, что взаимодействие различных лигандов с ДНК подробно исследовано, в то время как малочисленны исследования взаимодействия лигандов с РНК. Однако, лиганды, взаимодействуя с РНК, также могут изменить процессы реализации генетической информации на различных этапах.

В представленной работе в качестве лигандов выбраны ДНК-специфические лиганды: интеркаляторы бромистый этидий (БЭ), метиленовый синий (МС) и желобково-связывающееся соединение Hoechst 33258 (H33258). Исследования проводились в условиях ионной силы раствора 0.04 и 0.1 М.

Диссертационная работа З.О. Мовсисян состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, насчитывающего 137 наименований. Работа изложена на 125 страницах, включает 29 рисунок и 6 таблиц.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи диссертационной работы, приведены практическая и научная ценности работы, а также положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена обзору литературы. В данной главе описаны современные представления о структуре РНК, в частности, представлены структура и функции полирибоадениловой и полирибоуридиловой кислот. Особенно важно то, что автор уделяла внимание на биологическую роль этих гомополинуклеотидных

последовательностей, которые, как выясняется, играют определяющую роль в процессах генной экспрессии. Подробно обсуждены также механизмы связывания различных биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами. В данной главе также представлены интересные данные о геносенсорах и геночипах, в основе работы которых лежат процессы гибридизации одиночных цепей нуклеиновых кислот и их взаимодействие с малыми молекулами или биологически активными соединениями. Ознакомление с этой главой оставляет благоприятное впечатление и указывает на хорошую осведомленность диссертанта в данной области.

Во второй главе описаны использованные материалы и методы исследований. В работе были применены современные высокочувствительные методы, такие как, флуоресцентная, абсорбционная спектроскопии. Особо можно отметить то, что в работе применены теоретические методы анализа экспериментальных данных математическими формулами, которые позволили автору получить точные данные. Важно также отметить, что автором получены 2D и 3D спектры флуоресценции комплексов МС с оц-poly(rA), оц-poly(rU) и с гибридным poly(rA)-poly(rU), что позволило выявить и достоверно объяснить, что дц-специфический лиганд МС предпочтительнее связывается с оц-poly(rA). Полученные указанными методами данные адекватны поставленным задачам и не оставляют сомнения в достоверности.

В третьей главе автор приводит полученные результаты и их обсуждение. Полученные данные в работе выявляют, что МС, кроме того, что связывается с дц-нуклеиновыми кислотами, проявляет сродство к оц-полинуклеотидам, при этом, спектроскопические данные свидетельствуют о том, что он проявляет более слабое сродство к оц-poly(rU), чем к poly(rA).

Также впервые выявлено, что интеркалирующее соединение МС предпочтительнее связывается с оц-poly(rA), чем с poly(rA)-poly(rU). Одним из важных результатов работы является то, что МС с poly(rA) и с poly(rA)-poly(rU) связывается кооперативно, в то время как с poly(rU) кооперативность не обнаруживается. Также выявлено, что этот лиганд может связываться с оц-poly(rU) более чем одним способом. По крайней мере два способа связывания выявляются и при взаимодействии классического интеркалятора БЭ и классического желобкового соединения Н33258 с указанными полинуклеотидами.

Одним из важных результатов является то, что гибридизация, при смешивании комплементарных оц-poly(rA) и poly(rU) эквимольной концентрацией, наиболее эффективна в присутствии БЭ, в то время как H33258, который проявляет сродство к дц-нуклеиновым кислотам, практически не влияет на гибридизацию вышеотмеченных оц-полинуклеотидов. Показано также, что процесс гибридизации, а также сродство этих лигандов к указанным полинуклеотидам, зависят от ионной силы раствора и более эффективны при ионной силы раствора 0.04 М.

Диссертационная работа З.О. Мовсисян сформулирована четко, на надлежащем уровне, иллюстрирована графиками. Некоторые технические ошибки, которые имеются в тексте, никак не могут влиять на общий высокий уровень представленной работы.

Однако у меня есть некоторые вопросы к автору работы:

1. Из кривых связывания в координатах Скетчарда выявляется, что взаимодействие МС с poly(rA) и poly(rA)-poly(rU) кооперативное. При этом, фактор кооперативности вдвое больше в случае связывания МС с оц-poly(rA), по сравнению с poly(rA)-poly(rU). Было бы желательно, чтобы этот вопрос обсуждался более детально, исходя из того, кооперативность связана с типом лиганда, или структурой полинуклеотида.
2. На основании полученных данных автор утверждает, что БЭ и H33258 с указанными полинуклеотидами связываются по крайней мере двумя способами, исходя из того, что кривые связывания в координатах Скетчарда непрямолинейные. Однако, такие кривые получаются и при взаимодействии лигандов с НК одним способом, с учётом исключенных мест связывания. Чем можно обосновать существование двух способов связывания?

Обобщая вышеприведенное можно сказать, что диссертационная работа несет в себе принципиально новую и ценную научную информацию об особенностях взаимодействия ДНК-специфических лигандов с синтетическими полирибонуклеотидами, выступающими в качестве модели РНК.

Результаты исследований автора докладывались на конференциях, опубликованы в 9 научных трудах, которые вполне отражают содержание работы и включены в нее. Автореферат соответствует содержанию диссертации, выводы основываются на полученных результатах диссертации.

